ÍSLENSK útgáfa

EES-viðbætir

við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins

ISSN 1022-9337

Nr. 73

27. árgangur

12.11.2020

I EES-STOFNANIR

1. Sameiginlega EES-nefndin

2020/EES/73/01 Tilmæli ráðsins frá 15. mars 2018 um evrópskan ramma um gæði og skilvirkni samningsbundins náms 1

2020/EES/73/02 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2018/998 frá 12. júlí 2018 um breytingu á I. viðauka við ákvörðun 2009/177/EB að því er varðar stöðu Króatíu með tilliti til skjónakarpaherpesveiki og stöðu Finnlands með tilliti til iðradreps, skrána yfir svæði á Írlandi sem eru laus við ostruveiki, skrána yfir svæði í Bretlandi sem eru laus við martelíuveikisýkil og um breytingu á I. viðauka við ákvörðun 2010/221/ESB að því er varðar skrána yfir svæði í Bretlandi sem eru laus við ostruherpesveiru 1 µvar (OsHV-1 µVar) 7

2020/EES/73/03 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2019/142 frá 29. janúar 2019 um viðurkenningu á U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol til að sýna fram á að viðmiðunum um sjálfbærni samkvæmt tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB og 2009/28/EB hafi verið fylgt 10

2020/EES/73/04 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2018/1854 frá 27. nóvember 2018 um viðurkenningu á valfrjálsu áætluninni „Better Biomass“ til að sýna fram á að viðmiðunum um sjálfbærni samkvæmt tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB og 2009/28/EB hafi verið fylgt 12

2020/EES/73/05 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2019/1783 frá 1. október 2019 um breytingu á reglugerð (ESB) nr. 548/2014 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar litla, meðalstóra og stóra aflspenna 14

2020/EES/73/06 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2019/1782 frá 1. október 2019 um kröfur varðandi visthönnun ytri aflgjafa samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB og um niðurfellingu á reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 278/2009 28

2020/EES/73/07 Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2019/856 frá 26. febrúar 2019 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB að því er varðar starfsemi nýsköpunarsjóðsins 40

2020/EES/73/08 Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2019/128 frá 16. janúar 2019 um að koma á fót Evrópumiðstöð fyrir þróun starfsmenntunar (Cedefop), og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 337/75 52

2020/EES/73/09 Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 596/2014 frá 16. apríl 2014 um markaðssvik (reglugerð um markaðssvik) og um niðurfellingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 2003/124/EB, 2003/125/EB og 2004/72/EB 68

2020/EES/73/10 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2018/1832 frá 5. nóvember 2018 um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB, reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1151 í því skyni að bæta gerðarviðurkenningarprófanir og -aðferðir að því er varðar losun léttra farþega- og atvinnuökutækja, þ.m.t. prófanir og aðferðir vegna samræmis ökutækja í notkun og losunar þeirra í raunverulegum akstri og innleiðingu búnaðar til að vakta eldsneytis- og raforkunotkun. 129

2020/EES/73/11 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2019/1390 frá 31. júlí 2019 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)) 443

II EFTA-STOFNANIR

1. Fastanefnd EFTA-ríkjanna

2. Eftirlitsstofnun EFTA

3. EFTA-dómstóllinn

III ESB-STOFNANIR

1. Framkvæmdastjórnin

EES-STOFNANIR

SAMEIGINLEGA EES-NEFNDIN

TILMÆLI RÁÐSINS **2020/EES/73/01**

frá 15. mars 2018

um evrópskan ramma um gæði og skilvirkni samningsbundins náms

2018/C 153/01 (*)

RÁÐ EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins, einkum 166. gr. (4. mgr.) og 292. gr., í tengslum við 153. gr. (2. mgr.) og 153 gr. (b-liður 1. mgr.),

með hliðsjón af tillögu framkvæmdastjórnarinnar,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Gæði og skilvirkni samningsbundins náms sem miðar að því að sameina starfstengda færni, starfsreynslu og nám, sem og lykilhæfni, auðveldar ungu fólki að koma inn á vinnumarkaðinn og fullorðnum við að þróa áfram starfsferil sinn og að komast í atvinnu. Samningsbundið nám er hluti af formlegum starfsmenntunarkerfum og er samhliða öðrum náms- og/eða starfsmenntunarleiðum á vinnustað.

2) Vel útfært kerfi samningsbundins náms kemur bæði vinnuveitendum og nemum til góða og styrkir tengslin milli atvinnulífs og menntunar og þjálfunar. Með því að gera miklar kröfur um gæði er hægt að komast hjá því að samningsbundnu námi sé beint að störfum sem krefjast lítillar færni og lítillar þjálfunar sem skaðar orðspor námsins. Samningsbundið nám af miklum gæðum getur, auk þess að vera leið til að skara fram úr, stuðlað að því að efla virka þátttöku borgaranna og að félagslegri aðild með því að veita fólki með ólíkan félagslegan og persónubundinn bakgrunn aðgang að vinnumarkaðnum.

3) Gæði og skilvirkni samningsbundins náms myndast með skipulegu samstarfi sem tekur til allra viðeigandi hagsmunaaðila, einkum aðila vinnumarkaðarins, fyrirtækja, millilliða s.s. iðnaðar-, verslunar- og iðngreinaráða, samtaka faggreina og starfsgreina í ákveðnum geirum, starfsmenntastofnana, æskulýðs- og foreldrasamtaka, sem og staðbundinna, svæðisbundinna og landsbundinna yfirvalda. Allt frá 2013 hefur framkvæmdastjórnin, í samvinnu við aðildarríkin og viðeigandi hagsmunaaðila, eflt framboð, gæði og ímynd samningsbundins náms með hjálp Evrópusamtakanna um samningsbundið nám, sem hafa til þessa sett fram yfir 700 000 tilboð um samningsbundið nám, starfsþjálfun eða tilboð um fyrsta starf. Framtaksverkefni á vegum fyrirtækja á borð við Evrópusamninginn um æskulýðsmál hafa leitt til fleiri boða og aðstoðað við að efla samstarfsverkefni milli atvinnulífs og menntastofnana alls staðar í Sambandinu.

4) Heildarsamtök aðila vinnumarkaðarins í Evrópu hafa safnað gögnum, með áherslu á gæði og kostnaðarhagkvæmni samningsbundins náms, með því að vinna samhliða og sameiginlegri yfirlýsingu sinni með heitinu „Í átt að sameiginlegri sýn á samningsbundið nám“ frá júní 2016 sem var grundvöllur álits um „sameiginlega sýn á gæði og skilvirkni samningsbundins náms og náms á vinnustað“ sem ráðgjafarnefndin um starfsmenntun (e. Advisory Committee on Vocational Training (ACVT)) samþykkti 2. desember 2016.

5) Framkvæmdastjórnin skipulagði tvisvar, 30. mars og 7. júní 2017, áheyrnarfundi með heildarsamtökum og sérgreinasamtökum aðila vinnumarkaðarins í Evrópu og verslunar-, iðnaðar- og iðngreinaráðum í þeim tilgangi að tryggja enn öflugri og víðtækari þátttöku hagsmunaaðila.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB C 153, 2.5.2018, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 221/2018 frá 26. október 2018 um breytingu á bókun 31 við EES-samninginn, um samvinnu á sérstökum sviðum utan marka fjórþætta frelsisins (bíður birtingar).

6) Evrópski viðmiðaramminn um menntun og hæfi (EQF), sem var fyrst komið á árið 2008 og endurskoðaður 2017 ([1]), bætir gagnsæi, samanburðarhæfi og flytjanleika menntunar og hæfis borgara, þ.m.t. lærlinga.

7) Með tilmælum Evrópuþingsins og ráðsins frá 18. júní 2009 um evrópskan viðmiðunarramma til að tryggja gæði starfsmenntunar (EQAVET) ([2]) var komið á fót viðmiðunartæki sem gagnast aðildarríkjum við að stuðla að og fylgjast með stöðugum úrbótum í starfsmenntunarkerfum sínum.

8) Í Evrópusáttmálanum um gæðamál fyrir starfsnám og samningsbundið nám frá 2012 hvatti Evrópuráðið um málefni ungs fólks Evrópulönd, evrópskar stofnanir og aðila vinnumarkaðarins til að koma á fót eða efla lagalega gæðaramma fyrir samningsbundið nám.

9) Í tilmælum ráðsins frá 22. apríl 2013 um að koma á fót atvinnutryggingu fyrir unga fólkið (e. Youth Guarantee) ([3]) er mælst til þess að aðildarríki tryggi að allt ungt fólk undir 25 ára aldri fái gott tilboð um atvinnu, áframhaldandi nám, samningsbundið nám eða starfsþjálfun innan fjögurra mánaða frá því að þau verða atvinnulaus eða ljúka formlegu námi.

10) Í sameiginlegri yfirlýsingu við stofnun Evrópusamtaka um samningsbundið nám 2. júlí 2013 skuldbundu aðilar vinnumarkaðarins í Evrópu, framkvæmdastjórn Evrópusambandsins og formennskuríki leiðtogaráðsins, Litháen, sig til að stuðla að auknu framboði, gæðum og aðdráttarafli samningsbundins náms.

11) Í yfirlýsingu ráðsins um Evrópusamtökin um samningsbundið nám frá 15. október 2013 var áréttað að ýta skyldi undir skilvirkni og aðdráttarafl samningsbundins náms með því að sjá til þess að það fylgdi nokkrum sameiginlegum leiðbeinandi meginreglum.

12) Með tilmælum ráðsins um gæðaramma fyrir starfsþjálfun ([4]), sem voru samþykkt 10. mars 2014, voru nokkrar meginreglur innleiddar til að auka gæði starfsþjálfunar sem fellur utan formlegrar menntunar og þjálfunar.

13) Innan ramma Kaupmannahafnarferlisins fyrir Evrópusamstarf um starfsmenntun var í niðurstöðum fundar í Ríga 22. júní 2015, sem ráðherrar starfsmenntunarmála árituðu, ákveðið að gera hvers kyns nám á vinnustað, með sérstakri áherslu á samningsbundið nám, ásamt þróun gæðatryggingakerfa, að tveimur af fimm evrópskum forgangsverkefnum á tímabilinu 2015-2020.

14) Vinnuhópur um starfsmenntun innan ramma Evrópusamstarfs á sviði menntunar og þjálfunar (e. Education and Training 2020) þróaði 20 leiðbeinandi meginreglur um mjög skilvirkt samningsbundið nám og nám á vinnustað á skipunartíma sínum 2014-2015.

15) Í skýrslu Evrópuþingsins um Erasmus+ áætlunina og aðrar leiðir til að stuðla að hreyfanleika á sviði starfsmenntunar, með áherslu á ævinám frá 4. mars 2016, var lögð áhersla á að gerðar yrðu ráðstafanir til að tryggja gæðastaðla fyrir samningsbundið nám.

16) Í reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2016/589 ([5]) er mælt fyrir um að heimilt sé að auglýsa frá maí 2018 samningsbundið nám sem er byggt á ráðningarsamningi á vefgáttinni fyrir hreyfanleika á vinnumarkaði (EURES-vefgáttinni).

17) Í orðsendingu sinni frá 10. júní 2016 með yfirskriftinni „Áætlun um nýja færni fyrir Evrópu“ lagði framkvæmdastjórnin áherslu á stuðning sinn við að aðilar vinnumarkaðarins þróuðu áfram niðurstöður sameiginlegra verkefna sinna, t.d. með því að koma á fót gæðaramma fyrir samningsbundið nám.

18) Í orðsendingu framkvæmdastjórnarinnar „Fjárfest í æskulýð Evrópu“ frá 7. desember 2016 ([6]) var kallað eftir nýju átaki til að styðja ungt fólk til að standa sem best að vígi í lífinu með því að fjárfesta í þekkingu þeirra, færni og reynslu og hjálpa því við að finna eða mennta sig fyrir fyrsta starf. Markmiðið var að hjálpa ungu fólki til að grípa tækifæri, aðlagast þjóðfélaginu vel, verða virkir borgarar og vinna að farsælli starfsævi, m.a. með því að nota gæðaramma þar sem tilgreindar eru helstu meginreglur kerfis samningsbundins náms.

19) Í Rómaryfirlýsingunni frá 25. mars 2017 er sett fram áskorun um að vinna að Sambandi þar sem ungt fólk öðlast bestu menntun og þjálfun og getur stundað nám og fundið störf víðsvegar um álfuna.

([1]) Stjtíð. ESB C 189, 15.6.2017, bls. 15.
([2]) Stjtíð. ESB C 155, 8.7.2009, bls. 1.
([3]) Stjtíð. ESB C 120, 26.4.2013, bls. 1.
([4]) Stjtíð. ESB C 88, 27.3.2014, bls. 1.
([5]) Stjtíð. ESB L 107, 22.4.2016, bls. 1.
([6]) COM(2016) 940, lokagerð.

20) Í Evrópustoð félagslegra réttinda, sem tilkynnt var um 17. nóvember 2017, eru settar fram ýmsar meginreglur til stuðnings réttlátum og skilvirkum vinnumörkuðum og velferðarkerfum, m.a. rétturinn til menntunar og þjálfunar af miklum gæðum fyrir alla, til að unnt sé að tryggja færni og hæfni sem skipta máli fyrir atvinnulífið og þátttöku í samfélaginu.

21) Tillaga framkvæmdastjórnarinnar að tilmælum ráðsins um fylgja eftir ferli þeirra sem lokið hafa námi, sem var samþykkt 30. maí 2017, miðar að því að bæta aðgengi að eigindlegum og megindlegum upplýsingum um hvað brautskráðir einstaklingar, þ.m.t. lærlingar, gera eftir að þeir hafa lokið menntun sinni og þjálfun.

22) Uppbyggingar- og fjárfestingarsjóðir Evrópu (2014-2020), nánar tiltekið Félagsmálasjóður Evrópu og Byggðaþróunarsjóður Evrópu, sem og Erasmus+ áætlunin, áætlun Sambandsins um samkeppnishæfni fyrirtækja og lítilla og meðalstórra fyrirtækja, áætlun Sambandsins um atvinnumál og félagslega nýsköpun og framtaksverkefnið um atvinnumál unga fólksins styðja við samningsbundið nám.

23) Nýlega hvöttu Evrópuþingið og hagsmunaaðilar framkvæmdastjórnina til að efla langtímahreyfanleika lærlinga alls staðar í Evrópu og veita ungu fólki tækifæri til að þróa bæði starfstengda færni og lykilhæfni. Framkvæmdastjórnin brást við með því að innleiða nýja starfsemi í Erasmus+ áætlunina undir heitinu Erasmus Pro sem styrkir sérstaklega lengri dvöl vegna starfsþjálfunar erlendis.

24) Í skýrslum sínum um atvinnutryggingu fyrir unga fólkið frá 2015 og 2017 mæltist Endurskoðunarréttur Evrópusambandsins til þess að framkvæmdastjórnin þróaði gæðaviðmiðanir fyrir samningsbundið nám og önnur boð sem studd eru innan ramma þessa framtaksverkefnis.

25) Sameiginlegur skilningur aðildarríkjanna á gæðum og skilvirkni samningsbundins náms styður viðleitni þeirra til að endurbæta og nútímavæða kerfi samningsbundins náms sem bjóða upp á framúrskarandi nám og starfsþróun. Sameiginlegur skilningur stuðlar að því að auka gagnkvæmt traust og greiðir þannig fyrir hreyfanleika lærlinga yfir landamæri.

26) Meginmarkmið þessara tilmæla er að auka ráðningarhæfi og persónulegan þroska lærlinga og stuðla að því að þróa mjög hæft og menntað vinnuafl sem mætir þörfum vinnumarkaðarins.

27) Sértæka markmiðið er að mynda samræmdan ramma um samningsbundið nám sem byggist á sameiginlegum skilningi á því hvað skilgreinir gæði og skilvirkni, með tilliti til fjölbreytni og hefða starfsmenntunarkerfa og forgangsröðunar við stefnumótun í hinum ýmsu aðildarríkjum.

28) Þessi tilmæli hafa ekki áhrif á valdheimildir aðildarríkjanna til að viðhalda eða setja ákvæði um samningsbundið nám sem ganga lengra en þau sem tilmæli þessi taka til né heldur á að viðhalda eða þróa annars konar nám á vinnustað og/eða starfsmenntun sem fellur utan gildissviðs tilmælanna og beita þar, að fullu eða að hluta til, þeim viðmiðunum sem settar eru fram hér á eftir.

SAMÞYKKT TILMÆLI ÞESSI:

Aðildarríkin ættu, í samræmi við landslög og í náinni samvinnu við hagsmunaaðila, að tryggja að kerfi samningsbundins náms mæti þörfum vinnumarkaðarins og sé til ávinnings fyrir bæði nema og vinnuveitendur, með því að byggja á þeim viðmiðunum um gæði og skilvirkni samningsbundins náms sem settar eru fram hér á eftir.

Í þessum tilmælum og með fyrirvara um landsbundna hugtakanotkun er litið á hugtakið samningsbundið nám sem formlegt starfsmenntunarkerfi sem:

a) sameinar nám í mennta- eða námsstofnunum og umtalsvert nám á vinnustað í fyrirtækjum og á öðrum vinnustöðum,

b) veitir staðfestingu á menntun og hæfi sem er viðurkennt á landsvísu,

c) byggist á samningi sem skilgreinir réttindi og skyldur nemans, vinnuveitandans og, eftir því sem við á, starfsmenntastofnunarinnar og

d) þar sem nemi fær greiðslur eða annars konar umbun fyrir vinnuþáttinn.

Viðmiðanir varðandi náms- og vinnuskilyrði

Skriflegir samningar

1. Áður en samningsbundið nám hefst ætti að gera skriflegan samning þar sem skilgreind eru réttindi og skyldur lærlingsins, vinnuveitandans og, eftir því sem við á, starfsmenntastofnunarinnar, í tengslum við náms- og vinnuskilyrði.

Hæfniviðmið

2. Vinnuveitendur og starfsmenntastofnanir og, eftir því sem við á, stéttarfélög ættu að koma sér saman um röð ítarlegra hæfniviðmiða sem eru skilgreind í samræmi við landslög. Þetta ætti að tryggja jafnvægi milli starfstengdrar færni, þekkingar og lykilhæfni til að stunda ævinám sem styður bæði persónulegan þroska og atvinnutækifæri nemanna alla ævi og aðlögun að breytingum á starfsferlinum.

Kennslufræðilegur stuðningur

3. Tilnefna ætti þjálfara á vinnustöðum, sem skulu eiga náið samstarf við starfsmenntastofnanir og kennara til að veita lærlingum leiðsögn og tryggja gagnkvæma og reglubundna endurgjöf. Kennarar, þjálfarar og leiðbeinendur, einkum í örfyrirtækjum og litlum og meðalstórum fyrirtækjum, ættu að fá stuðning til að uppfæra færni sína, þekkingu og hæfni til þess að þjálfa lærlinga samkvæmt nýjustu kennslu- og þjálfunaraðferðum og þörfum vinnumarkaðarins.

Þáttur sem fer fram á vinnustað

4. Verulegur hluti samningsbundins náms, þ.e.a.s. minnst helmingur þess, ætti að fara fram á vinnustaðnum og fela í sér tækifæri, þar sem mögulegt er, til að öðlast hluta reynslunnar á vinnustað erlendis. Að teknu tilliti til fjölbreytilegra kerfa í aðildarríkjunum er stefnt að því að smám saman aukist sá hluti samningsbundins náms sem fram fer á vinnustað.

Greiðsla og/eða umbun

5. Lærlingar ættu að fá greiðslu eða annars konar umbun, í samræmi við kröfur á landsvísu eða innan einstakra greina eða í kjarasamningum þar sem um slíka er að ræða, og að teknu tilliti til fyrirkomulags kostnaðarskiptingar milli vinnuveitenda og opinberra yfirvalda.

Félagsleg vernd

6. Lærlingar ættu að hafa rétt til félagslegrar verndar, m.a. nauðsynlegra trygginga í samræmi við landslöggjöf.

Vinnuskilyrði, heilbrigðis- og öryggisaðstæður

7. Gistivinnustaðurinn ætti að uppfylla viðeigandi reglur og reglugerðir um vinnuskilyrði, einkum löggjöf um heilbrigði og öryggi starfsfólks.

Viðmiðanir vegna rammaskilyrða

Reglurammi

8. Skýr og samræmdur reglurammi ætti að vera fyrir hendi, byggður á sanngjarnri og réttlátri samstarfsnálgun, þ.m.t. skipulegum og gagnsæjum skoðanaskiptum milli allra viðkomandi hagsmunaaðila. Þetta getur falið í sér faggildingarferli fyrir fyrirtæki og vinnustaði sem bjóða samningsbundið nám og/eða aðrar gæðatryggingarráðstafanir.

Þátttaka aðila vinnumarkaðarins

9. Aðilar vinnumarkaðarins, þ.m.t., ef við á, innan sérgreina og/eða milliliðir, ættu að taka þátt í hönnun, stjórnun og framkvæmd kerfa samningsbundins náms, í samræmi við samskiptakerfi aðila vinnumarkaðarins og starfsvenjur á sviði menntunar og þjálfunar.

Stuðningur við fyrirtæki

10. Gera ætti ráð fyrir fjárhagslegum stuðningi og/eða stuðningi öðrum en fjárhagslegum stuðningi, einkum við örfyrirtæki og lítil og meðalstór fyrirtæki, sem gerir fyrirtækjum kleift að bjóða kostnaðarhagkvæmt samningsbundið nám, að teknu tilliti til fyrirkomulags vegna kostnaðarskiptingar, þegar við á, milli vinnuveitenda og opinberra yfirvalda.

Sveigjanleg framvinda og hreyfanleiki

11. Til að greiða fyrir aðgangi að samningsbundnu námi ættu inntökukröfur að taka tillit til viðeigandi formlauss og óformlegs náms og/eða undirbúningsnáms sem lokið er, ef við á. Fella ætti menntun og hæfi sem fæst með samningsbundnu námi inn í ramma um menntun og hæfi sem eru viðurkenndir á landsvísu og vísa í evrópska viðmiðarammann um menntun og hæfi ([1]). Samningsbundið nám ætti að veita aðgang að öðrum námstækifærum, einnig á æðri menntunar- og þjálfunarstigum, leiðum til starfsframa og/eða, ef við á, til söfnunar eininga hæfniviðmiða. Stig af stigi ætti að stuðla að hreyfanleika lærlinga milli landa, annaðhvort á vinnustöðum eða í mennta- og námsstofnunum, sem liðar í menntun og hæfi samningsbundins náms.

Starfsráðgjöf og vitundarvakning

12. Veita ætti starfsráðgjöf, leiðsögn og stuðning við nema áður en samningsbundið nám hefst og meðan á því stendur til að tryggja góðan árangur, koma í veg fyrir og draga úr brottfalli sem og til að styðja nema til endurkomu inn á viðeigandi menntunar- og þjálfunarleiðir. Kynna ætti samningsbundið nám sem áhugaverða námsleið með aðgerðum til vitundarvakningar sem beinast að breiðum markhópi.

Gagnsæi

13. Tryggja ætti gagnsæi og aðgang að samningsbundnu námi innan og milli aðildarríkjanna, þ.m.t. með stuðningi opinberra og einkarekinna vinnumiðlana sem og annarra viðeigandi aðila og, þegar við á, með því að nota verkfæri Sambandsins á borð við EURES, eins og kveðið er á um í EURES-reglugerðinni.

Gæðatrygging og ferlum lærlinga fylgt eftir

14. Til staðar ættu að vera aðferðir til gæðatryggingar, sem taka tillit til evrópska viðmiðunarrammans til að tryggja gæði starfsmenntunar (EQAVET) ([2]), þ.m.t. ferli sem leiðir til gilds og áreiðanlegs mats á námsárangri. Fylgja ætti eftir hvernig starfi og starfsþróun lærlinga vindur fram í samræmi við landslög og Evrópulöggjöf um gagnavernd.

Framkvæmd á landsvísu

Með tilliti til framkvæmdar þessara tilmæla ættu aðildarríkin, innan gildissviðs tilmælanna, að:

15. stuðla að virkri þátttöku aðila vinnumarkaðarins við hönnun, stjórnun og framkvæmd kerfa samningsbundins náms, í samræmi við samskiptakerfi aðila vinnumarkaðarins og skipulag menntunar og þjálfunar,

16. tryggja jafnan aðgang, stuðla að jöfnu hlutfalli kynjanna og takast á við mismunun í kerfum samningsbundins náms,

17. fella viðeigandi ráðstafanir til framkvæmdar inn í landsbundnar umbótaáætlanir Evrópuannarinnar (e. European Semester),

18. taka tillit til þessa ramma við þegar fjármagn og fjármögnunarleiðir Evrópusambandsins eru notuð til að styðja við samningsbundið nám.

Framkvæmdastjórnin ætti að veita nauðsynlegan stuðning, m.a. með eftirfarandi aðgerðum:

Stuðningsþjónusta

19. Að þróa stuðningsþjónustu til miðlunar á þekkingu, til tengslamyndunar og gagnkvæms lærdóms til að aðstoða aðildarríkin og viðkomandi hagsmunaaðila við framkvæmd kerfa samningsbundins náms í samræmi við þennan ramma. Þetta ætti að ná yfir þörf starfsmenntakennara og leiðbeinenda á frekari þjálfun að því er varðar stafrænar nýjungar í samningsbundnu námi.

Vitundarvakning

20. Að stuðla að framúrskarandi gæðum og aðdráttarafli samningsbundins náms og gefa ungu fólki, fjölskyldum þeirra og vinnuveitendum jákvæða mynd af því með herferðum til vitundarvakningar á borð við Evrópsku starfsmenntavikuna (e. European Vocational Skills Week).

([1]) Stjtíð. ESB C 189, 15.6.2017, bls. 15.
([2]) Stjtíð. ESB C 155, 8.7.2009, bls. 1.

Fjármögnun

21. Að styðja við framkvæmd þessara tilmæla með viðeigandi fjármögnun Sambandsins, í samræmi við viðeigandi lagaramma.

Eftirfylgni

22. Að fylgjast með framkvæmd þessara tilmæla með stuðningi þríhliða ráðgjafarnefndar um starfsmenntun á grundvelli fyrirliggjandi eftirlitsleiða sem notaðar eru innan ramma Evrópuannarinnar.

23. Að gefa ráðinu skýrslu um framkvæmd þessa ramma innan þriggja ára frá samþykkt hans.

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2018/998 **2020/EES/73/02**

frá 12. júlí 2018

um breytingu á I. viðauka við ákvörðun 2009/177/EB að því er varðar stöðu Króatíu með tilliti til skjónakarpaherpesveiki og stöðu Finnlands með tilliti til iðradreps, skrána yfir svæði á Írlandi sem eru laus við ostruveiki, skrána yfir svæði í Bretlandi sem eru laus við martelíuveikisýkil og um breytingu á I. viðauka við ákvörðun 2010/221/ESB að því er varðar skrána yfir svæði í Bretlandi sem eru laus við ostruherpesveiru 1 µvar (OsHV-1 µVar)

(tilkynnt með númeri C(2018) 4381) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 2006/88/EB frá 24. október 2006 um heilbrigðiskröfur að því er varðar lagareldisdýr og afurðir þeirra og um forvarnir og varnir gegn tilteknum sjúkdómum í lagardýrum ([1]), einkum 43. gr. (2 .mgr.), 49. gr. (1. mgr.), 50. gr. (3. mgr.), 51. gr. (2. mgr.) og 53. gr. (3. mgr.),

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í C-hluta I. viðauka við ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2009/177/EB ([2]) er sett fram skrá yfir aðildarríki, svæði og hólf sem lýst hefur verið yfir að séu laus við tiltekna sjúkdóma sem um getur í II. hluta IV. viðauka við tilskipun 2006/88/EB.

2) Í skránni er sem stendur allt yfirráðasvæði Króatíu lýst laust við skjónakarpaherpesveiki og allt yfirráðasvæði Finnlands lýst laust við iðradrep. Á undanförnum árum hafa þessi aðildarríki þó lýst nokkrum uppkomum þessara sjúkdóma, eftir því sem við á.

3) Bæði aðildarríkin hafa sent upplýsingar til framkvæmdastjórnarinnar þar sem tilgreint er að þau hafi gert ráðstafanir í samræmi við tilskipun 2006/88/EB til að takast á við þessar uppkomur. Þessar ráðstafanir eru enn í framkvæmd á sumum svæðum.

4) Í skránni er sem stendur öll strandlengja Írlands lýst laus við ostruveiki að undanskildum átta flóum. Vegna nýlegrar uppkomu ostruveiki, sem átti sér stað í öðrum flóa á svæði Írlands sem var skráð sem laust við þann sjúkdóm, hefur takmörkunum verið komið á í samræmi við tilskipun 2006/88/EB og er þeim enn beitt.

5) Enn fremur er öll strandlengja Norður-Írlands lýst laus við martelíuveikisýkil. Þó hefur Bretland lýst uppkomu þessa sjúkdóms í tveimur mismunandi flóum á Norður-Írlandi. Í samræmi við tilskipun 2006/88/EB hafa verið settar takmarkanir á tilflutning sem enn er beitt.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 178, 16.7.2018, bls. 9. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 107/2019 frá 8. maí 2019 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB L 328, 24.11.2006, bls. 14.

([2]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2009/177/EB frá 31. október 2008 um framkvæmd tilskipunar ráðsins 2006/88/EB að því er varðar eftirlits- og útrýmingaráætlanir og sjúkdómalausa stöðu aðildarríkja, svæða og hólfa (Stjtíð. ESB L 63, 7.3.2009, bls. 15).

6) Í samræmi við upplýsingarnar frá Króatíu, Finnlandi, Írlandi og Bretlandi ætti ekki að skrá viðkomandi svæði sem laus við viðkomandi sjúkdóm og því ætti að uppfæra landfræðilega afmörkun sjúkdómalausra svæða fyrir Króatíu, Finnland, Írland og Bretland.

7) Í I. viðauka við ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2010/221/ESB ([1]) er sett fram skrá yfir aðildarríki, svæði og hólf sem talið er að séu laus við tiltekna sjúkdóma sem ekki er getið í II. hluta IV. viðauka við tilskipun 2006/88/EB.

8) Í skránni telst sem stendur yfirráðasvæði Norður-Írlands í Bretlandi vera laust við ostruherpesveiru 1 µvar (OsHV-1 µVar) að undanskildum tilteknum flóum. Vegna nýlegrar uppkomu OsHV-1 µVar sem átti sér stað í öðrum flóa ætti að uppfæra landfræðileg afmörkun sjúkdómalausa svæðisins fyrir Bretland.

9) Því ætti að breyta I. viðauka við ákvörðun 2009/177/EB og I. viðauka við ákvörðun 2010/221/ESB til samræmis við það.

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

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Í töflunni í C-hluta I. viðauka við ákvörðun 2009/177/EB er fjórða dálki, „Landfræðileg afmörkun sjúkdómalausa svæðisins (aðildarríki, svæði eða hólf)“, breytt sem hér segir:

1) Í stað færslunnar fyrir Króatíu í línunni „Skjónakarpaherpesveiki“ kemur eftirfarandi: „Allt yfirráðasvæðið, nema eftirfarandi svæði: svæðið sem nær yfir lagareldisfyrirtækið við Donji Miholjac (samþykkisnúmer 2HR0109) og ána Drava frá stíflunni Dubrava að mynni hennar við Dóná og svæðið sem nær yfir lagareldisfyrirtækið við Grudnjak (samþykkisnúmer 2HR0177) og allt vatnsfall árinnar Vučica að mynni hennar við ána Karašica og þaðan frá ánni Karašica að mynni hennar við ána Drava“.

2) Í stað færslunnar fyrir Finnland í línunni „Iðradrep (IHN)“ kemur eftirfarandi: „Allt yfirráðasvæði, nema hólf strandlengjunnar í Ii, Kuivaniemi, og eftirfarandi vatnasvið: 14.72 Virmasvesi, 14.73 Nilakka, 4.74 svæði Saarijärvi og 4.41 svæði Pielinen“.

3) Í stað færslunnar fyrir Írland í línunni „Sýking af völdum ostruveikisýkils (*Bonamia ostreae*)“ kemur eftirfarandi:

„Öll strandlengja Írlands, nema:

1. Cork Harbour,
2. Galway Bay,
3. Ballinakill Harbour,
4. Clew Bay,
5. Achill Sound,
6. Loughmore, Blacksod Bay,
7. Lough Foyle,
8. Lough Swilly,
9. Kilkieran Bay.“

4) Í stað færslunnar fyrir Bretland í línunni „Sýking af völdum martelíuveikisýkils (*Marteilia refringens*)“ kemur eftirfarandi:

„Öll strandlengja Stóra-Bretlands.

Öll strandlengja Norður-Írlands, nema Belfast Lough og Dundrum Bay.

([1]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2010/221/ESB frá 15. apríl 2010 um samþykki á landsráðstöfunum til að takmarka áhrif tiltekinna sjúkdóma í lagareldisdýrum og villtum lagardýrum í samræmi við 43. gr. tilskipunar ráðsins 2006/88/EB (Stjtíð. ESB L 98, 20.4.2010, bls. 7).

Öll strandlengja Guernsey og Herm.

Strandsvæði Jersey: svæðið samanstendur af ströndinni þar sem sjávarfalla gætir og svæðinu næst ströndinni milli meðalflóðmarka á eyjunni Jersey og ímyndaðrar línu sem dregin er þrjár sjómílur frá meðalfjörumörkum á eyjunni Jersey. Svæðið er í flóanum milli Normandí og Bretagne, sunnan við Ermarsund.

Öll strandlengja Manar.“

2. gr.

Í stað færslunnar fyrir Bretland í I. viðauka við ákvörðun 2010/221/ESB í töflunni í fjórða dálki „Landfræðileg afmörkun svæðisins sem fellur undir samþykktar landsráðstafanir“, í línunni „Ostruherpesveira 1 µvar (OsHV-1 µVar)“, kemur eftirfarandi:

„Yfirráðasvæði Stóra-Bretlands, nema áin Roach, áin Crouch, Blackwater Estuary og River Colne í Essex, norðurströnd Kent, Poole Harbour í Dorset og River Teign í Devon

Yfirráðasvæði Norður-Írlands, nema Dundrum Bay, Killough Bay, Lough Foyle, Carlingford Lough, Larne Lough og Strangford Lough

Yfirráðasvæði Guernsey“.

3. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 12. júlí 2018.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Vytenis ANDRIUKAITIS

framkvæmdastjóri.

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/142 **2020/EES/73/03**

frá 29. janúar 2019

um viðurkenningu á U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol til að sýna fram á að viðmiðunum um sjálfbærni samkvæmt tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB og 2009/28/EB hafi verið fylgt (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB frá 13. október 1998 um gæði bensíns og dísileldsneytis og breytingu á tilskipun ráðsins 93/12/EBE ([1]), einkum annarri undirgrein 4. mgr. 7. gr. c,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/28/EB frá 23. apríl 2009 um að auka notkun orku frá endurnýjanlegum orkugjöfum og um breytingu og síðar niðurfellingu á tilskipunum 2001/77/EB og 2003/30/EB ([2]), einkum annarri undirgrein 4. mgr. 18. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í 7. gr. b og 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og í IV. viðauka við hana og í 17. og 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB og í V. viðauka við hana er mælt fyrir um svipaðar viðmiðanir um sjálfbærni fyrir lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti og svipaðar málsmeðferðarreglur um sannprófun á því að lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti uppfylli þessar viðmiðanir.

2) Þegar telja skal lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti með að því er a-, b- og c-lið 1. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB varðar, verða aðildarríkin að krefjast þess að rekstraraðilar sýni fram á að lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti uppfylli viðmiðanirnar um sjálfbærni sem settar eru fram í 2.–5. mgr. 17. gr. þeirrar tilskipunar.

3) Beiðni um að viðurkenna að „U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol“ sýni fram á að lífeldsneytissendingar uppfylli viðmiðanir um sjálfbærni, sem settar eru fram í tilskipunum 98/70/EB og 2009/28/EB, var lögð fyrir framkvæmdastjórnina 15. nóvember 2018. Höfuðstöðvar kerfisins eru 16305 Swingley Ridge Road, Suite 200, Chesterfield, MO 63017, United States. Hún nær til sojabauna sem eru framleiddar í Bandaríkjunum og aðfangakeðjunnar frá býlunum þar sem sojabaunirnar eru framleiddar og á þann stað þaðan sem þær eru fluttar út.

4) Í mati sínu á „U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol“ komst framkvæmdastjórnin að þeirri niðurstöðu að kerfið taki með fullnægjandi hætti tillit til viðmiðana um sjálfbærni sem settar eru fram í tilskipun 98/70/EB og tilskipun 2009/28/EB og beiti massajöfnuðarkerfi í samræmi við 1. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og 1. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB.

5) Í matinu á „U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol“ kom fram að það stenst með fullnægjandi hætti kröfur um áreiðanleika, gagnsæi og óháða endurskoðun og uppfyllir einnig aðferðafræðilegar kröfur í IV. viðauka við tilskipun 98/70/EB og V. viðauka við tilskipun 2009/28/EB.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit nefndarinnar um sjálfbærni lífeldsneytis og fljótandi lífeldsneytis.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

„U.S. Soybean Sustainability Assurance Protocol“ (hér eftir nefnt „kerfið“), en beiðni um viðurkenningu þess var lögð fyrir framkvæmdastjórnina 15. nóvember 2018, sýnir að sendingar af lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti, sem er framleitt í samræmi við staðla fyrir framleiðslu á lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti sem settir eru fram í áætluninni, uppfylla þær viðmiðanir um sjálfbærni sem mælt er fyrir um í 3., 4. og 5. mgr. 7. gr. b í tilskipun 98/70/EB og 3., 4. og 5. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB.

Kerfið inniheldur nákvæm gögn að því er varðar 2. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB og 2. mgr. 7. gr. b í tilskipun 98/70/EB að því er varðar losun, á ársgrundvelli, vegna breytinga á kolefnisbirgðum vegna breytinga á landnýtingu (e_l), sem um getur í 1. lið C-hluta IV. viðauka við tilskipun 98/70/EB og 1. lið C-hluta V. viðauka við tilskipun 2009/28/EB, sem sýnt er fram á að jafngildi núlli.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 26, 30.1.2019, bls. 10. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 157/2019 frá 13. júní 2019 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. EB L 350, 28.12.1998, bls. 58.

([2]) Stjtíð. EB L 140, 5.6.2009, bls. 16.

2. gr.

Tilkynna skal framkvæmdastjórninni án tafar um allar breytingar á innihaldi kerfisins, eins og þær eru lagðar fyrir framkvæmdastjórnina til viðurkenningar 15. nóvember 2018, sem gætu haft áhrif á grundvöll þessarar ákvörðunar.

Framkvæmdastjórnin leggur mat á tilkynntar breytingar með það fyrir augum að ákvarða hvort kerfið taki enn með fullnægjandi hætti til viðmiðana um sjálfbærni sem liggja að baki viðurkenningu þess.

3. gr.

Framkvæmdastjórnin getur fellt þessa ákvörðun úr gildi, m.a. við eftirfarandi aðstæður:

a) ef sýnt er fram á það með skýrum hætti að kerfið komi ekki til framkvæmda þáttum sem eru mikilvægir fyrir þessa ákvörðun eða ef alvarlegt rof hefur orðið í uppbyggingu þessara þátta,

b) ef ekki er lögð ársskýrsla fyrir framkvæmdastjórnina vegna kerfisins skv. 6. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og 6. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB,

c) ef ekki eru innleiddir staðlar með kerfinu vegna óháðrar endurskoðunar, sem eru tilgreindir í framkvæmdargerðum samkvæmt þriðju undirgrein 5. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og þriðju undirgrein 5. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB, eða endurbætur á öðrum þáttum kerfisins sem teljast vera mikilvægir fyrir áframhaldandi viðurkenningu.

4. gr.

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

Hún gildir til 30. júní 2021.

Gjört í Brussel 29. janúar 2019.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2018/1854 **2020/EES/73/04**

frá 27. nóvember 2018

um viðurkenningu á valfrjálsu áætluninni „Better Biomass“ til að sýna fram á að viðmiðunum um sjálfbærni samkvæmt tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB og 2009/28/EB hafi verið fylgt (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB frá 13. október 1998 um gæði bensíns og dísileldsneytis og breytingu á tilskipun ráðsins 93/12/EBE ([1]), einkum annarri undirgrein 4. mgr. 7. gr. c,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/28/EB frá 23. apríl 2009 um að auka notkun orku frá endurnýjanlegum orkugjöfum og um breytingu og síðar niðurfellingu á tilskipunum 2001/77/EB og 2003/30/EB ([2]), einkum annarri undirgrein 4. mgr. 18. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í 7. gr. b og 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og í IV. viðauka við hana og í 17. og 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB og í V. viðauka við hana er mælt fyrir um svipaðar viðmiðanir um sjálfbærni fyrir lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti og svipaðar málsmeðferðarreglur um sannprófun á því að lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti uppfylli þessar viðmiðanir.

2) Þegar telja skal lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti með að því er varðar a-, b- og c-lið 1. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB ættu aðildarríkin að krefjast þess að rekstraraðilar sýni að lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti uppfylli viðmiðanirnar um sjálfbærni sem settar eru fram í 2.–5. mgr. 17. gr. þeirrar tilskipunar.

3) Framkvæmdastjórnin getur ákveðið að valfrjálsar landsbundnar eða alþjóðlegar áætlanir, sem setja staðla um framleiðslu lífmassaafurða, innihaldi nákvæm gögn að því er varðar 2. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB og/eða sýni fram á að sendingar af lífeldsneyti eða fljótandi lífeldsneyti uppfylli viðmiðanirnar um sjálfbærni sem settar eru fram í 3., 4. og 5. mgr. 17. gr. og/eða að engum efnum hafi verið breytt af ásetningi eða þeim fleygt til að sendingin eða hluti hennar myndi falla undir IX. viðauka. Þegar rekstraraðili leggur fram sannanir eða gögn, sem aflað er í samræmi við valfrjálsa áætlun sem framkvæmdastjórnin hefur viðurkennt, að því marki sem þau falla undir þá ákvörðun um viðurkenningu, ætti aðildarríki ekki að krefjast þess að birgir leggi fram frekari gögn sem sýna fram á að viðmiðanirnar um sjálfbærni hafi verið uppfylltar.

4) Beiðni um að viðurkenna að valfrjálsa áætlunin „Better Biomass“ sýni fram á að lífeldsneytissendingar uppfylli viðmiðanir um sjálfbærni, sem settar eru fram í tilskipunum 98/70/EB og 2009/28/EB, var lögð fyrir framkvæmdastjórnina 20. febrúar 2018. Áætlunin, sem hefur aðsetur í Vlinderweg 6, NL-2623 AX Delft, Hollandi (Niðurlandi), nær yfir margs konar hráefni, þ.m.t. úrgang og leifar og alla aðfangakeðjuna. Gera ætti skjöl viðurkenndu áætlunarinnar aðgengileg á gagnsæisvettvanginum sem var komið á fót samkvæmt tilskipun 2009/28/EB.

5) Í mati sínu á valfrjálsu áætluninni „Better Biomass“ komst framkvæmdastjórnin að þeirri niðurstöðu að hún taki með fullnægjandi hætti tillit til viðmiðana um sjálfbærni sem settar eru fram í tilskipun 98/70/EB og tilskipun 2009/28/EB, auk þess sem beitt er massajöfnuðaraðferð í samræmi við kröfur 1. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og 1. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB.

6) Í mati á valfrjálsu áætluninni „Better Biomass“ kom fram að hún uppfyllir með fullnægjandi hætti kröfur um áreiðanleika, gagnsæi og óháða endurskoðun og uppfyllir einnig aðferðafræðilegar kröfur í IV. viðauka við tilskipun 98/70/EB og V. viðauka við tilskipun 2009/28/EB.

7) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit nefndarinnar um sjálfbærni lífeldsneytis og fljótandi lífeldsneytis.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 302, 28.11.2018, bls. 73. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 255/2019 frá 25. október 2019 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. EB L 350, 28.12.1998, bls. 58.

([2]) Stjtíð. ESB L 140, 5.6.2009, bls. 16.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Valfrjálsa ætlunin „Better Biomass“ (hér á eftir nefnd „áætlunin“), en beiðni um viðurkenningu hennar var lögð fyrir framkvæmdastjórnina 20. febrúar 2018, sýnir að sendingar á lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti, sem er framleitt í samræmi við staðla fyrir framleiðslu á lífeldsneyti og fljótandi lífeldsneyti sem settir eru fram í áætluninni, uppfylla viðmiðanir um sjálfbærni eins og mælt er fyrir um í 3., 4. og 5. mgr. 7. gr. b í tilskipun 98/70/EB og 3., 4. og 5. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB.

Áætlunin inniheldur einnig nákvæm gögn að því er varðar 2. mgr. 17. gr. tilskipunar 2009/28/EB og 2. mgr. 7. gr. b í tilskipun 98/70/EB.

2. gr.

Ef gerðar eru breytingar á efni áætlunarinnar, eins og hún var lögð fyrir framkvæmdastjórnina 20. febrúar 2018 til viðurkenningar, sem kunna að hafa áhrif á grundvöll þessarar ákvörðunar, skal tilkynna framkvæmdastjórninni um breytingarnar án tafar. Framkvæmdastjórnin leggur mat á tilkynntar breytingar með það fyrir augum að ákvarða hvort áætlunin taki enn með fullnægjandi hætti til viðmiðana um sjálfbærni sem liggja að baki viðurkenningu hennar.

3. gr.

Framkvæmdastjórnin getur fellt þessa ákvörðun úr gildi, m.a. við eftirfarandi aðstæður:

a) ef sýnt hefur verið fram á það með skýrum hætti að áætlunin hafi ekki komið til framkvæmda þáttum sem hafa afgerandi þýðingu fyrir þessa ákvörðun eða ef alvarlegt rof hefur orðið í uppbyggingu þessara þátta,

b) ef ekki er lögð ársskýrsla fyrir framkvæmdastjórnina vegna áætlunarinnar skv. 6. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og 6. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB,

c) ef ekki eru innleiddir staðlar með áætluninni vegna óháðrar endurskoðunar, sem eru tilgreindir í framkvæmdargerðum sem um getur í þriðju undirgrein 5. mgr. 7. gr. c í tilskipun 98/70/EB og þriðju undirgrein 5. mgr. 18. gr. tilskipunar 2009/28/EB, eða endurbætur á öðrum hlutum áætlunarinnar sem teljast hafa afgerandi þýðingu fyrir áframhaldandi viðurkenningu.

4. gr.

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

Hún gildir til 18. desember 2023.

Gjört í Brussel 27. nóvember 2018.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/1783 2020/EES/73/05

frá 1. október 2019

um breytingu á reglugerð (ESB) nr. 548/2014 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar litla, meðalstóra og stóra aflspenna (*)

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.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í 7. gr. reglugerðar framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 548/2014 ([2]) er gerð krafa um að framkvæmdastjórnin endurskoði reglugerðina í ljósi tækniframfara og kynni niðurstöður endurskoðunarinnar á samráðsvettvanginum árið 2017.

2) Framkvæmdastjórnin hefur gert rannsókn á endurskoðuninni þar sem hún greindi sérstaka þætti sem settir eru fram í 7. gr. reglugerðar (ESB) nr. 548/2014. Rannsóknin var framkvæmd í samvinnu við hagsmunaaðila og hlutaðeigandi aðila frá Sambandinu og hafa niðurstöðurnar verið gerðar aðgengilegar öllum.

3) Rannsóknin staðfesti að orkunotkun á notkunartíma hafi enn mestu áhrifin á hnatthlýnunarmáttinn. Greiningin sem gerð var skilaði ekki niðurstöðum sem þykja nægja til að leggja til umhverfiskröfur aðrar en lágmarkskröfu um orkunýtingu.

4) Rannsóknin staðfesti að reglugerð (ESB) nr. 548/2014 hefur haft jákvæð áhrif á nýtni aflspenna sem settir eru á markað og leiddi í ljós að fáanlegar tegundir aflspenna geti hæglega uppfyllt lágmarkskröfurnar sem settar eru í þrepi 1 (júlí 2015).

5) Almennt er viðurkennt að sú aðferð sem er mest viðeigandi til að besta hönnun aflspenna svo að lágmarka megi raforkutap er enn þá mat og eignfærsla framtíðartaps með því að nota rétta eignfærslustuðla fyrir álagstöp og tómgangstöp í útboðsferlinu. Að því er varðar reglusetningu um framleiðsluvörur kemur þó einungis til greina að nota gildi sem mælt er fyrir um fyrir lágmarksnýtni eða hámarkstöp.

6) Rannsóknin staðfesti einnig að framleiðendur standi ekki frammi fyrir verulegum tæknilegum hindrunum í tengslum við framleiðslu á aflspennum sem samræmast lágmarkskröfunum sem settar eru fram í þrepi 2, sem öðlast gildi í júlí 2021.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 272, 25.10.2019, bls. 107. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 129/2020 frá 25. september 2020 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) og IV. viðauka (Orka) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB L 285, 31.10.2009, bls. 10.

([2]) 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).

7) Í rannsókninni var greint hvort aflspennar, sem uppfylla lágmarkskröfurnar sem settar eru fram í þrepi 2 og gilda frá og með júlí 2021, beri sig fjárhagslega og kom þar í ljós að þegar meðalstórir og stórir aflspennar, sem uppfylla kröfur, eru teknir í notkun á nýjum uppsetningarstöðum er vistferilskostnaður þeirra alltaf lægri en sá kostnaður sem fylgir tegundum sem uppfylla kröfurnar í þrepi 1. Við tilteknar aðstæður þar sem meðalstórir aflspennar eru settir upp í fyrirliggjandi aðveitustöðvum í þéttbýli kunna hins vegar að vera rýmis- og þyngdartakmarkanir sem hafa áhrif á hámarksstærð og -þyngd þeirra útskiptispenna (e. *replacement transformer*) sem koma í staðinn. Því ætti að vera réttlætanlegt að slaka á reglum ef það er tæknilega ógerlegt að skipta út fyrirliggjandi aflspenni eða ef slíkt hefur óhóflegan kostnað í för með sér.

8) Að því er varðar útskipti á stórum aflspennum ætti fyrirliggjandi undanþága frá reglum, sem tengist óhóflegum kostnaði sem fylgir flutningi og/eða uppsetningu þeirra, einnig að gilda um nýjar stöðvar þar sem slíkar kostnaðarhömlur eiga einnig við.

9) Reynslan sýnir að veitufyrirtæki eða aðrir rekstraraðilar geta verið með aflspenna á lager í lengri tíma áður en þeir eru settir upp á lokastað. Það ætti þó áfram að vera skýrt að sýna ætti fram á að viðeigandi kröfur séu uppfylltar, annaðhvort þegar aflspennirinn er settur á markað eða þegar hann var tekinn í notkun, en ekki í báðum tilvikum.

10) Sökum þess að það er til markaður fyrir viðgerðir á aflspennum er nauðsynlegt að gefa leiðbeiningar um það við hvaða aðstæður aflspennir, sem tilteknar viðgerðir hafa verið gerðar á, ætti að teljast jafngildur nýrri framleiðsluvöru og ætti því að uppfylla kröfurnar sem settar eru fram í I. viðauka við þessa reglugerð.

11) Til að auka skilvirkni þessarar reglugerðar og til að vernda neytendur ætti að banna að vörur, sem breyta frammistöðu sinni sjálfkrafa við prófunarskilyrði til að bæta tilgreinda mæliþætti, séu settar á markað eða teknar í notkun.

12) Til að greiða fyrir sannprófunum ættu markaðseftirlitsyfirvöld að fá að framkvæma prófun, eða vera vitni að prófun, á stærri aflspennum á athafnasvæðum eins og þeim sem tilheyra framleiðandanum.

13) Reynslan af framkvæmd reglugerðar (ESB) nr. 548/2014 hefur leitt í ljós að til staðar eru landsbundin frávik í staðalspennu í rafdreifikerfum tiltekinna aðildarríkja. Þessi frávik réttlæta mismunandi viðmiðunarmörk fyrir spennu í flokkun spennubreyta og gefa til kynna hvaða lágmarkskröfur um orkunýtingu ættu að eiga við. Því er réttlætanlegt að koma á tilkynningarkerfi til að vekja athygli á tilteknum aðstæðum í aðildarríkjum.

14) 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.

Reglugerð (ESB) nr. 548/2014 er breytt sem hér segir:

1) Í stað 1. gr. kemur eftirfarandi:

„1. gr.

Efni og gildissvið

1. Með þessari reglugerð eru settar fram kröfur varðandi visthönnun að því er varðar að setja á markað eða taka í notkun aflspenna með lágmarksmálafl sem nemur 1 kVA sem notaðir eru í 50 Hz raforkuflutnings- og dreifikerfi eða til notkunar í iðnaði.

Reglugerð þessi gildir um aflspenna sem keyptir eru eftir 11. júní 2014.

2. Þessi reglugerð gildir ekki um aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir í eftirfarandi tilgangi:

a) mælispenna sem eru sérstaklega hannaðir til að senda upplýsingamerki til mælitækja, mæla, varnar- eða stjórnbúnaðar og annarra svipaðra tækja,

b) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir og ætlaðir til að veita jafnspennu til rafeindaálags eða afriðilsálags; þessi undanþága tekur ekki til aflspenna sem eru ætlaðir til að veita riðstraum frá jafnstraumsgjöfum, eins og aflspenna fyrir vindhverfla og ljósspennueiningar eða aflspenna sem hannaðir eru fyrir jafnstraumssendingu og -dreifingu,

c) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir til að vera tengdir beint við bræðsluofn,

d) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir til uppsetningar á föstum eða fljótandi pöllum á hafi úti, vindhverflum á hafi úti eða um borð í skipum og öðrum förum,

e) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir fyrir aðstæður sem vara í takmarkaðan tíma þegar rof verður á venjulegum straumi annaðhvort vegna atviks sem ekki er gert ráð fyrir (eins og bilun í aflgjafa) eða vegna endurbóta á stöð, en ekki til að uppfæra með varanlegum hætti fyrirliggjandi aðveitustöð,

f) aflspenna (með einvöf eða aðskilin vöf) sem tengdir eru við riðstraums- eða jafnstraumssnertilínu, annaðhvort beint eða með straumbreyti, og notaðir eru í föstum búnaði sem notaður er fyrir járnbrautir,

g) aflspenna til jarðtenginga, sem eru sérstaklega hannaðir til að vera tengdir við raforkukerfi til að vera núlltenging fyrir annaðhvort beina jarðtengingu eða jarðtengingu í gegnum samviðnám,

h) dráttarspenna, sem eru sérstaklega hannaðir til að vera festir á járnbrautarvagna, tengdir við riðstraums- eða jafnstraumstengilínu, annaðhvort beint eða með straumbreyti, og til tiltekinnar notkunar í föstum búnaði sem notaður er fyrir járnbrautir,

i) ræsispenna sem eru sérstaklega hannaðir til að ræsa þriggja fasa spanhreyfla til að koma í veg fyrir dýfur í afhendingarspennu og sem slökkt er á við venjulega notkun,

j) prófunarspenna sem eru sérstaklega hannaðir til að nota í rás til að framleiða tiltekna spennu eða straum til prófunar á rafbúnaði,

k) suðuspenna sem eru sérstaklega hannaðir til að nota í rafsuðubúnaði eða viðnámssuðubúnaði,

l) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir fyrir búnað sem er sprengiheldur, í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 94/9/EB (*), og til námugraftar neðanjarðar,

m) aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir til notkunar í djúpu vatni (í kafi),

n) tengispenna frá millispennubúnaði (MV) í millispennubúnað (MV) upp að 5 MVA, notaðir við spennubreytingu í kerfi og komið fyrir á mótum tveggja spennustiga í tveimur millispennukerfum og sem þurfa að geta ráðið við yfirálag sem myndast í neyðartilvikum,

o) meðalstóra og stóra aflspenna sem eru sérstaklega hannaðir til að stuðla að öryggi kjarnorkuvirkja eins og skilgreint er í 3. gr. tilskipunar ráðsins 2009/71/KBE (**),

p) þriggja fasa meðalstóra aflspenna með málafl undir 5 kVA,

nema að því er varðar kröfurnar sem settar eru fram í a-, b- og d-lið 4. liðar í I. viðauka við þessa reglugerð.

3. Meðalstórir og stórir aflspennar skulu, óháð því hvenær þeir voru fyrst settir á markað eða teknir í notkun, gangast undir endurmat á samræmi og skulu uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar, ef eftirfarandi aðgerðir hafa verið framkvæmdar á þeim:

a) kjarna, eða hluta hans, hefur verið skipt út,

b) einu eða fleiri heilum vöfum hefur verið skipt út.

Þetta er með fyrirvara um lagalegar skuldbindingar samkvæmt annarri samræmingarlöggjöf Sambandsins sem kunna að eiga við um þessar vörur.

(*) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 94/9/EB frá 23. mars 1994 um samhæfingu laga aðildarríkjanna varðandi búnað og öryggiskerfi sem eru ætluð til notkunar á sprengihættustöðum (Stjtíð. EB L 100, 19.4.1994, bls. 1).

(**) Tilskipun ráðsins 2009/71/KBE frá 25. júní 2009 um ramma Bandalagsins um öryggi kjarnorkuvirkja með tilliti til kjarnorku (Stjtíð. ESB L 172, 2.7. 2009, bls. 18).“

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

a) Í stað 3. og 4. liðar kemur eftirfarandi:

„3) „Meðalstór aflspennir“: aflspennir þar sem öll vöf hafa málafl sem er lægra en eða jafnt og 3150 kVA, og hæstu rekstrarspennu búnaðar sem er hærri en 1,1 kV en lægri en eða jöfn og 36 kV.

4) „Stór aflspennir“: aflspennir með a.m.k. eitt vaf sem hefur annaðhvort málafl sem er hærra en 3150 kVA eða hæstu rekstrarspennu búnaðar sem er hærri en 36 kV.“

b) Í stað 7. liðar kemur eftirfarandi:

„7) „Meðalstór stauraspennir“: aflspennir með málafl allt að 400 kVA sem hentar til notkunar utanhúss og er sérstaklega hannaður til að festa á burðarstoðir loftraflínu.“

c) Eftirfarandi 17. til 22. liður bætist við 2. gr.:

„17) „Yfirlýst gildi“: gildin sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB, og eftir atvikum, gildin sem notuð eru til að reikna út þessi gildi.

18) „Aflspennir með tvöfaldri spennu“: aflspennir með eitt eða fleiri vöf þar sem tvær spennur eru tiltækar til að starfa og veita málafl á annarri af tveimur virkum spennum.

19) „Prófun í viðurvist vitnis“: virk athugun með efnislegri prófun á vöru, sem annar aðili hefur til rannsóknar, í þeim tilgangi að draga ályktanir um marktæki prófunarinnar og niðurstaðna úr prófuninni; þetta getur falið í sér ályktanir um reglufylgni prófunar- og útreikningsaðferða, sem notaðar eru, við viðeigandi staðla og löggjöf.

20) „Samþykkisprófun í verksmiðju“: prófun á pantaðri vöru þar sem viðskiptavinurinn notar prófun í viðurvist vitnis til að sannreyna að varan sé í fullu samræmi við samningsbundnar kröfur áður en varan er samþykkt eða tekin í notkun.

21) „Sambærileg tegund“: tegund með sömu tæknilegu eiginleika sem máli skipta hvað varðar tækniupplýsingar sem veita skal, en er sett á markað eða tekin í notkun af sama framleiðanda eða innflytjanda sem önnur tegund með annað tegundarauðkenni.

22) „Tegundarauðkenni“: kóði, venjulega alstafa, sem greinir tiltekna vörutegund frá öðrum tegundum með sama vörumerki eða nafni framleiðanda eða innflytjanda.“

3) Ákvæðum 3. gr. er breytt sem hér segir:

„Kröfurnar varðandi visthönnun, sem settar eru fram í I. viðauka, skulu gilda frá þeim dagsetningum sem þar eru tilgreindar.

Ef viðmiðunarmörk fyrir spennu í rafmagnsdreifikerfum víkja frá staðalgildum í Sambandinu (*) skulu aðildarríki tilkynna það framkvæmdastjórninni svo að hægt sé að gefa út opinbera tilkynningu um rétta túlkun taflna I.1, I.2, I.3a, I.3b, I.4, I.5, I.6, I.7, I.8 og I.9 í I. viðauka.

(*) Í 2. viðauka B í staðli Rafstaðlasamtaka Evrópu (Cenelec) EN 60038 er að finna landsbundið frávik fyrir Tékkland en samkvæmt því er staðalspenna í hæstu rekstrarspennu búnaðar í þrífasa riðstraumskerfum 38,5 kV í stað 36 kV og 25 kV í stað 24 kV.“

4) Ákvæðum 4. gr. er breytt sem hér segir:

„4. gr.

Samræmismat

1. Aðferðin við samræmismat, sem um getur í 8. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skal vera innra hönnunareftirlitskerfið, sem sett er fram í IV. viðauka við þá tilskipun, eða stjórnunarkerfið, sem sett er fram í V. viðauka við þá tilskipun.

2. Að því er varðar samræmismat skv. 8. gr. tilskipunar 2009/125/EB skulu tæknigögnin innihalda afrit af vöruupplýsingunum sem veittar eru í samræmi við 4. lið í I. viðauka og upplýsingar og niðurstöður útreikninganna sem settir eru fram í II. viðauka við þessa reglugerð.

3. Þegar upplýsinganna í tæknigögnum tiltekinnar tegundar hefur verið aflað:

a) á grundvelli tegundar með sömu tæknilegu eiginleika sem máli skipta hvað varðar tækniupplýsingarnar sem veita skal en er framleidd af öðrum framleiðanda eða

b) með útreikningi á grundvelli hönnunar eða með framreikningi á grundvelli annarrar tegundar frá sama eða öðrum framleiðanda, eða með báðum þessum aðferðum,

skulu tæknigögnin innihalda upplýsingar um þessa útreikninga, hvaða mat framleiðandinn hefur gert til að staðfesta nákvæmni útreikninganna og, þar sem við á, yfirlýsingu sem staðfestir að tegundir frá mismunandi framleiðendum eru eins.

4. Tæknigögnin skulu innihalda skrá yfir allar jafngildar tegundir, þ.m.t. tegundarauðkenni.“

5) Í stað 7. gr. kemur eftirfarandi:

„7. gr.

Endurskoðun

Framkvæmdastjórnin skal endurskoða þessa reglugerð í ljósi tækniframfara og kynna niðurstöður matsins, þ.m.t., ef við á, drög að tillögu um endurskoðun, á samráðsvettvanginum eigi síðar en 1. júlí 2023. Við endurskoðunina skal einkum meta eftirfarandi:

— að hvaða marki kröfurnar, sem settar voru fyrir þrep 2, hafa verið kostnaðarhagkvæmar og hvort viðeigandi sé að innleiða strangari kröfur í þrepi 3,

— hvort tilslakanir, sem innleiddar voru fyrir meðalstóra og stóra aflspenna, séu viðeigandi í þeim tilvikum þar sem kostnaður við uppsetningu hefði verið óhóflegur,

— hvort mögulegt sé að nota útreikninginn á toppgildi orkunýtnistuðuls (PEI) fyrir töp, til viðbótar við töp í algildum, fyrir meðalstóra aflspenna,

— hvort mögulegt sé að taka upp nálgun sem er hlutlaus í tæknilegu tilliti að því er varðar lágmarkskröfurnar sem settar eru fyrir vökvaspenna, þurrspenna og mögulega rafeindaspenna,

— hvort viðeigandi sé að setja lágmarkskröfur um orkunýtingu fyrir litla aflspenna,

— hvort undanþágurnar fyrir aflspenna sem notaðir eru á hafi úti séu viðeigandi,

— hvort tilslakanir, sem veittar hafa verið vegna aflspenna sem festir eru á staura og vegna sérstakra spennusamsetninga vafa fyrir meðalstóra aflspenna, séu viðeigandi,

— hvort mögulegt og viðeigandi sé að taka tillit til annarra umhverfisáhrifa en orkunotkunar á notkunartímanum, eins og hávaða og efnisnýtni.“

6) Númeri 8. gr. er breytt í 9. gr. og nýrri 8. gr. er bætt við sem hér segir:

„8. gr.

Sniðganga

Framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndi fulltrúinn skal ekki setja á markað vörur sem eru þannig hannaðar að þær geti greint að verið sé að prófa þær (t.d. með því að þekkja aftur prófunarskilyrðin eða prófunarlotuna) og sem bregðast sérstaklega við með því að breyta sjálfkrafa frammistöðu sinni meðan á prófun stendur í þeim tilgangi að ná betri gildum fyrir einhvern þeirra mæliþátta sem framleiðandi, innflytjandi eða viðurkenndur fulltrúi hefur tilgreint í tæknigögnunum eða í einhverjum þeim gögnum sem fylgja með vörunni.“

7) Viðaukunum 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. október 2019.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Viðaukunum við reglugerð (ESB) nr. 548/2014 er breytt sem hér segir:

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

a) Ákvæðum 1. liðar er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrirsagnarinnar við töflu I.1 kemur eftirfarandi:

„Hámarkstöp með og án álags (í W) fyrir þriggja fasa meðalstóra **vökvaspenna** með annað vafið með $U_m \leq 24$ kV og hitt með $U_m \leq 3{,}6$ kV.“

ii. Í stað fyrirsagnarinnar við töflu I.2 kemur eftirfarandi:

„Hámarkstöp með og án álags (í W) fyrir þriggja fasa meðalstóra **þurrspenna** með annað vafið með $U_m \leq 24$ kV og hitt með $U_m \leq 3{,}6$ kV.“

iii. Eftirfarandi málsgreinar bætast við á eftir fyrstu málsgreinina:

„Frá og með þeim degi þegar kröfurnar í þrepi 2 koma til framkvæmda (1. júlí 2021), þegar það hefur óhóflegan uppsetningarkostnað í för með sér að skipta út fyrirliggjandi meðalstórum aflspenni fyrir sambærilegan spenni, þarf útskiptispennirinn, í sérstökum undantekningartilvikum, aðeins að uppfylla kröfur í þrepi 1 fyrir tiltekið málafl.

Í þessu samhengi er uppsetningarkostnaður talinn óhóflegur ef kostnaðurinn við að skipta alveg út aðveitustöðinni sem hýsir aflspenninn og/eða vegna kaupa eða leigu á viðbótargólfrými er hærri en hreint núvirði þess viðbótarraforkutaps sem komist er hjá (að tollum, sköttum og álögðum gjöldum undanskildum) með útskiptispenni sem uppfyllir kröfurnar fyrir þrep 2 á áætluðum endingartíma hans. Hreint núvirði skal reiknað með eignfærðum gildum fyrir töp með almennt viðurkenndu félagslegu afvöxtunarhlutfalli (*).

Í þessu tilviki skal framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndur fulltrúi láta eftirfarandi upplýsingar fylgja með í tæknigögnum útskiptispennisins:

— heimilisfang og samskiptaupplýsingar fyrir kaupanda útskiptispennisins,

— stöðina þar sem setja á útskiptispenninn upp; þetta skal auðkennt með ótvíræðum hætti með því að tilgreina annaðhvort tiltekna staðsetningu eða tiltekna gerð uppsetningar (t.d. stöðva- eða skápategund),

— tæknileg og/eða efnahagsleg rök fyrir þeim óhóflega kostnaði sem af hlýst við að setja upp aflspenni sem uppfyllir aðeins kröfur fyrir þrep 1 í stað þess að setja upp aflspenni sem uppfyllir kröfur fyrir þrep 2. Ef aflspennirinn eða aflspennarnir voru pantaðir í útboðsferli skal veita allar nauðsynlegar upplýsingar varðandi greiningu tilboða og ákvörðunina um hverjir urðu fyrir valinu.

Í framangreindum tilvikum skal framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndi fulltrúinn tilkynna það lögbærum landsbundnum markaðseftirlitsyfirvöldum.

(*) Í verkfærakassa framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins fyrir betri reglusetningu er lagt til að nota gildið 4% fyrir félagslegt afvöxtunarhlutfall https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/file_import/better-regulation-toolbox-61_en_0.pdf‘.

iv. Í stað töflu I.3 koma töflur I.3a og I.3b sem hér segir:

„Tafla I.3a

Leiðréttingarstuðlar sem beita skal á töp með eða án álags sem gefin eru upp í töflum I.1, I.2 og I.6 fyrir meðalstóra aflspenna með sérstakar spennusamsetningar vafa (fyrir málafl ≤ 3150 kVA)

Sérstök spennusamsetning í einu vafi		Álagstöp (P_k)	Tómgangstöp (P_0)
Fyrir bæði vökvaspenna (tafla I.1) og þurrspenna (tafla I.2)		Engin leiðrétting	Engin leiðrétting
Hæsta forvafsspenna búnaðar $U_m \leq 24$ kV	Hæsta eftirvafsspenna búnaðar $U_m > 3{,}6$ kV		
Fyrir vökvaspenna (tafla I.1)		10%	15%
Hæsta forvafsspenna búnaðar $U_m = 36$ kV	Hæsta eftirvafsspenna búnaðar $U_m \leq 3{,}6$ kV		

Sérstök spennusamsetning í einu vafi		Álagstöp (P_k)	Tómgangstöp (P_0)
Hæsta forvafsspenna búnaðar U_m = 36 kV	Hæsta eftirvafsspenna búnaðar U_m > 3,6 kV	10%	15%
Fyrir þurrspenna (tafla I.2)		10%	15%
Hæsta forvafsspenna búnaðar U_m = 36 kV	Hæsta eftirvafsspenna búnaðar $U_m \leq 3,6$ kV		
Hæsta forvafsspenna búnaðar U_m = 36 kV	Hæsta eftirvafsspenna búnaðar U_m > 3,6 kV	15%	20%

Tafla I.3b

Leiðréttingarstuðlar sem beita skal á töp með eða án álags sem gefin eru upp í töflum I.1, I.2 og I.6 fyrir meðalstóra aflspenna með tvöfalda spennu í öðru eða báðum vöfum þar sem munurinn er meiri en 10% og málafl ≤ 3150 kVA

Gerð tvöfaldrar spennu	Viðmiðunarspenna fyrir beitingu leiðréttingarstuðla	Álagstöp (P_k) (*)	Tómgangstöp (P_0) (*)
Tvöföld spenna á einu vafi með lækkað útafl á lægri spennu lágspennuvafs OG tiltækt hámarksafl fyrir lægri spennu lágspennuvafs á slíkum aflspennum skal takmarkast við 0,85 af málafli sem ætlað er lágspennuvafinu við hærri spennuna.	Töp skulu reiknuð út frá þeirri spennu sem hærri er í lágspennu-vafinu	Engin leiðrétting	Engin leiðrétting
Tvöföld spenna á einu vafi með lækkað útafl á lægri spennu háspennuvafs OG tiltækt hámarksafl fyrir lægri spennu háspennuvafs skal takmarkast við 0,85 af málafli sem ætlað er háspennuvafinu við hærri spennuna.	Töp skulu reiknuð út frá þeirri spennu sem hærri er í háspennu-vafinu	Engin leiðrétting	Engin leiðrétting
Tvöföld spenna á einu vafi OG fullt málafl tiltækt á báðum vöfum, þ.e. fullt nafnafl er tiltækt óháð spennusamsetningu.	Töp skulu reiknuð út frá þeirri spennu sem hærri er í tvöfalda spennuvafinu	10%	15%

Gerð tvöfaldrar spennu	Viðmiðunarspenna fyrir beitingu leiðréttingarstuðla	Álagstöp (P_k) (*)	Tómgangstöp (P_0) (*)
Tvöföld spenna á báðum vöfum OG málafl tiltækt á öllum samsetningum vafa, þ.e. báðar spennur á öðru vafinu skila fullu málafli í samsetningu við aðra hvora spennuna á hinu vafinu	Töp skulu reiknuð út frá þeim spennum sem hærri eru á báðum tvöföldu spennuvöfunum	20%	20%

(*) Töp skulu reiknuð út frá spennu vafsins sem tilgreint er í öðrum dálki og auka má við töpin með leiðréttingarstuðlunum sem gefnir eru upp í síðustu tveimur dálkunum. Í öllu falli mega töpin ekki fara yfir gildin sem gefin eru upp í töflum I.1, I.2 og I.6 þegar þau hafa verið leiðrétt með stuðlunum í þessari töflu, sama hver spennusamsetning vafa er.“

b) Í stað fyrstu málsgreinar í lið 1.4 kemur eftirfarandi:

„1.4. Hvað varðar útskipti á fyrirliggjandi meðalstórum stauraspennum fyrir sambærilegan spenni með málafl milli 25 kVA og 400 kVA eru viðeigandi hámarksgildi tapa með og án álags ekki þau sem er að finna í töflu I.1 og I. 2 heldur þau sem er að finna í töflu I.6 hér á eftir. Leyfileg hámarkstöp fyrir önnur málgildi í kVA en þau sem ekki eru sérstaklega tilgreind í töflu I.6 skulu fengin með línulegri brúun eða framreikningi. Leiðréttingarstuðlarnir fyrir sérstakar spennusamsetningar vafa sem gefnir eru upp í töflum I.3a og I.3b eiga einnig við.

Hvað varðar útskipti á fyrirliggjandi meðalstórum stauraspennum fyrir sambærilegan spenni skal framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndur fulltrúi láta eftirfarandi upplýsingar fylgja með í tæknigögnum aflspennisins:

— heimilisfang og samskiptaupplýsingar kaupanda útskiptispennisins,

— stöðina þar sem setja á útskiptispenninn upp; þetta skal auðkennt með ótvíræðum hætti með því að tilgreina annaðhvort staðsetningu eða tiltekna gerð uppsetningar (t.d. tæknilýsingu á staurnum).

Í framangreindum tilvikum skal framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndi fulltrúinn tilkynna það lögbærum landsbundnum markaðseftirlitsyfirvöldum.

Að því er varðar uppsetningu nýrra stauraspenna eru það kröfurnar í töflum I.1 og I.2, með hliðsjón af töflum I.3a og I.3b í rökstuddum tilvikum, sem eiga við.“

c) Í stað 2. liðar kemur eftirfarandi:

„2. **Kröfur um lágmarksorkunýtni fyrir stóra aflspenna**

Kveðið er á um kröfur varðandi lágmarksorkunýtni fyrir stóra aflspenna í töflum I.7, I.8 og I.9.

Það kunna að vera tilteknar aðstæður þar sem útskipti á fyrirliggjandi aflspenni eða uppsetning á nýjum aflspenni, sem uppfyllir viðeigandi lágmarkskröfur sem settar eru fram í töflum I.7, I.8 og I.9, myndi leiða til óhóflegs kostnaðar. Almennt má líta svo á að kostnaður geti talist vera óhóflegur þegar viðbótarkostnaður í tengslum við flutning og/eða uppsetningu á aflspenni, sem uppfyllir kröfur fyrir þrep 1 eða þrep 2, eftir því sem við á, væri hærri en hreint núvirði þess viðbótarraforkutaps sem komist er hjá (að tollum, sköttum og álögðum gjöldum undanskildum) á áætluðum endingartíma hans. Þetta hreina núvirði skal reiknað út á grundvelli eignfærðs virðistaps með almennt viðurkenndu félagslegu afvöxtunarhlutfalli (*).

Í þeim tilvikum gilda eftirfarandi varaákvæði:

Frá og með þeim degi þegar kröfurnar í þrepi 2 koma til framkvæmda (1. júlí 2021), þegar útskipti á stórum aflspenni, sem er á fyrirliggjandi stöð, fyrir sambærilegan spenni hefur í för með sér óhóflegan kostnað í tengslum við flutning og/eða uppsetningu hans, eða það er tæknilega óframkvæmanlegt, þarf útskiptispennirinn, í sérstökum undantekningartilvikum, aðeins að uppfylla kröfur í þrepi 1 fyrir tiltekið málafl.

Enn fremur skulu engar lágmarkskröfur gilda um útskiptispenni ef kostnaðurinn við að setja upp útskiptispenni, sem uppfyllir kröfur fyrir þrep 1, er óhóflegur, eða engar tæknilega mögulegar lausnir er fyrir hendi.

Frá og með þeim degi þegar kröfurnar í þrepi 2 koma til framkvæmda (1. júlí 2021), þegar uppsetning á nýjum stórum aflspenni á nýrri stöð hefur í för með sér óhóflegan kostnað í tengslum við flutning og/eða uppsetningu hans, eða hún er tæknilega óframkvæmanleg, þarf nýi spennirinn, í sérstökum undantekningartilvikum, aðeins að uppfylla kröfur í þrepi 1 fyrir tiltekið málafl.

Í þessum tilvikum skal framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndur fulltrúi sem ber ábyrgð á því að setja aflspenninn á markað eða taka hann í notkun:

láta eftirfarandi upplýsingar fylgja með í tæknigögnum nýja aflspennisins eða útskiptispennisins:

— heimilisfang og samskiptaupplýsingar kaupanda aflspennisins,

— nákvæma staðsetningu þar sem setja á aflspenninn upp,

— tæknileg og/eða efnahagsleg rök fyrir því að setja upp nýjan aflspenni eða útskiptispenni sem uppfyllir ekki kröfur í þrepi 2 eða þrepi 1; ef aflspennirinn eða aflspennarnir voru pantaðir í útboðsferli skal auk þess veita allar nauðsynlegar upplýsingar varðandi greiningu tilboða og ákvörðunina um hverjir urðu fyrir valinu,

— tilkynna það lögbærum landsbundnum markaðseftirlitsyfirvöldum.

Tafla I.7

Kröfur varðandi lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (PEI) fyrir stóra vökvaspenna

Málafl (MVA)	Þrep 1 (1.7.2015)	Þrep 2 (1.7.2021)
	Lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (%)	
≤ 0,025	97,742	98,251
0,05	98,584	98,891
0,1	98,867	99,093
0,16	99,012	99,191
0,25	99,112	99,283
0,315	99,154	99,320
0,4	99,209	99,369
0,5	99,247	99,398
0,63	99,295	99,437
0,8	99,343	99,473
1	99,360	99,484
1,25	99,418	99,487
1,6	99,424	99,494
2	99,426	99,502
2,5	99,441	99,514
3,15	99,444	99,518
4	99,465	99,532

Málafl (MVA)	Þrep 1 (1.7.2015)	Þrep 2 (1.7.2021)
	Lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (%)	
5	99,483	99,548
6,3	99,510	99,571
8	99,535	99,593
10	99,560	99,615
12,5	99,588	99,640
16	99,615	99,663
20	99,639	99,684
25	99,657	99,700
31,5	99,671	99,712
40	99,684	99,724
50	99,696	99,734
63	99,709	99,745
80	99,723	99,758
100	99,737	99,770
125	99,737	99,780
160	99,737	99,790
≥ 200	99,737	99,797

Nota skal línulegan innreikning til að reikna út lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls fyrir þau málgildi í MVA sem liggja á milli gildanna sem tilgreind eru í töflu I.7.

Tafla I.8

Kröfur varðandi lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (PEI) fyrir stóra þurrspenna með $U_m \leq 36$kV

Málafl (MVA)	Þrep 1 (1.7.2015)	Þrep 2 (1.7.2021)
	Lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (%)	
$3{,}15 < S_r \leq 4$	99,348	99,382
5	99,354	99,387
6,3	99,356	99,389
8	99,357	99,390
≥ 10	99,357	99,390

Nota skal línulegan innreikning til að reikna út lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls fyrir þau málgildi í MVA sem liggja á milli gildanna sem tilgreind eru í töflu I.8.

Tafla I.9

Kröfur varðandi lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (PEI) fyrir stóra þurrspenna með U_m > 36kV

Málafl (MVA)	Þrep 1 (1.7.2015)	Þrep 2 (1.7.2021)
	Lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls (%)	
≤ 0,05	96,174	96,590
0,1	97,514	97,790
0,16	97,792	98,016
0,25	98,155	98,345
0,4	98,334	98,570
0,63	98,494	98,619
0,8	98,677	98,745
1	98,775	98,837
1,25	98,832	98,892
1,6	98,903	98,960
2	98,942	98,996
2,5	98,933	99,045
3,15	99,048	99,097
4	99,158	99,225
5	99,200	99,265
6,3	99,242	99,303
8	99,298	99,356
10	99,330	99,385
12,5	99,370	99,422
16	99,416	99,464
20	99,468	99,513
25	99,521	99,564
31,5	99,551	99,592
40	99,567	99,607
50	99,585	99,623
≥ 63	99,590	99,626

Nota skal línulegan innreikning til að reikna út lágmarkstoppgildi orkunýtnistuðuls fyrir þau málgildi í MVA sem liggja á milli gildanna sem tilgreind eru í töflu I.9.

(*) Í verkfærakassa framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins fyrir betri reglusetningu er lagt til að nota gildið 4% fyrir félagslegt afvöxtunarhlutfall https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/file_import/better-regulation-toolbox-61_en_0.pdf“.

d) Í stað síðasta undirliðar í 3. lið komi eftirfarandi:

„Aðeins að því er varðar meðalstóra og stóra aflspenna: Upplýsingarnar í a-, c- og d-lið skulu einnig vera á merkispjaldi aflspennisins.“

e) Síðasta málsgrein 4. liðar fellur brott og nýr d-liður bætist við sem hér segir:

„d) sérstakar ástæður fyrir því að aflspennar teljast undanþegnir reglugerðinni í samræmi við 2. mgr. 1. gr.“

2) Í stað II. viðauka komi eftirfarandi:

„II. VIÐAUKI

Mæliaðferðir

Til þess að uppfylla kröfur þessarar reglugerðar skulu mælingar gerðar með áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum sem taka tillit til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggja 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*.

Reikniaðferðir

Aðferðin við útreikning á toppgildi orkunýtnistuðuls (PEI) fyrir meðalstóra og stóra aflspenna, sem um getur í töflum I.4, I.5, I.7, I.8 og I.9 í I. viðauka, byggir á hlutfallinu milli sýndaraflsins, sem aflspennir flytur, að frádregnum rafmagnstöpum og sýndaraflinu sem aflspennirinn flytur. Við útreikning á toppgildi orkunýtnistuðuls skal notast við nýjustu aðferðafræði sem tiltæk er í nýjustu útgáfu af viðkomandi samhæfðum stöðlum fyrir meðalstóra og stóra aflspenna.

Formúlan sem nota á fyrir útreikning á toppgildi orkunýtnistuðuls er:

$$\mathrm{PEI} = 1 - \frac{2\left(\mathrm{P_0} + \mathrm{P_{c0}} + \mathrm{P_{ck}}(k_{PEI})\right)}{\mathrm{S_r}\sqrt{\frac{\mathrm{P_0} + \mathrm{P_{c0}} + \mathrm{P_{ck}}(k_{PEI})}{\mathrm{P_k}}}} = 1 - \frac{2}{\mathrm{S_r}}\sqrt{\left(\mathrm{P_0} + \mathrm{P_{c0}} + \mathrm{P_{ck}}(k_{PEI})\right)\mathrm{P_k}}\ (\%)$$

Þar sem:

P_0	er tómgangstöp mæld við málspennu og máltíðni, við málúttakið.
P_{c0}	er rafaflið sem þarf fyrir kælikerfið fyrir tómgangsnotkun og er leitt út frá gerðarprófunarmælingunum á því afli sem viftu- og vökvadæluhreyflar nota (fyrir ONAN- og ONAN/ONAF-kælikerfi er P_{c0} alltaf núll).
P_{ck} (k_{PEI})	er rafaflið sem þarf fyrir kælikerfið til viðbótar við P_{c0} til að starfa við k_{PEI} sinnum málálagið. P_{ck} er fall af álaginu. P_{ck} (k_{PEI}) er leitt út frá gerðarprófunarmælingunum á því afli sem viftu- og vökvadæluhreyflar nota (fyrir ONAN-kælikerfi er P_{ck} alltaf núll).
P_k	er mælt álagstap við málstraum og máltíðni við málúttakið sem búið er að leiðrétta miðað við viðmiðunarhitastig.
S_r	er málafl aflspennisins eða einvafsspennisins, sem P_k er byggt á.
k_{PEI}	er álagsstuðullinn þar sem toppgildi orkunýtnistuðuls næst.“

3) Ákvæðum III. Viðauka ([1]) er breytt sem hér segir:

Eftirfarandi málsgrein bætist við á eftir fyrstu málsgrein:

„Ef tegund hefur verið hönnuð til að geta greint að verið sé að prófa hana (t.d. með því að þekkja aftur prófunarskilyrðin eða prófunarlotuna) og sem bregst sérstaklega við með því að breyta sjálfkrafa frammistöðu sinni meðan á prófun stendur í þeim tilgangi að ná betri gildum fyrir einhvern þeirra mæliþátta sem tilgreindir eru í þessari reglugerð eða í tæknigögnunum eða í einhverjum þeim gögnum sem fylgja með, telst tegundin og allar jafngildar tegundir ekki uppfylla kröfurnar.“

([1]) III. viðauki við reglugerð (ESB) nr. 548/2014 eins og henni var breytt með 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 (Stjtíð. ESB L 346, 20.12.2016, bls. 51).

Eftirfarandi bætist við í lok 1. liðar:

„Yfirvöldum aðildarríkisins er heimilt að framkvæma þessa sannprófun með sínum eigin prófunarbúnaði.

Ef áætlað er að framkvæma samþykkisprófanir í verksmiðju fyrir slíka aflspenna, þar sem prófa á þá mæliþætti sem mælt er fyrir um í I. viðauka við þessa reglugerð, er yfirvöldum aðildarríkis heimilt að nota prófun í viðurvist vitnis við þessar samþykkisprófanir í verksmiðju til að safna niðurstöðum úr prófunum sem hægt er að nota til að sannprófa hvort aflspennirinn, sem er til rannsóknar, uppfylli kröfur. Yfirvöldin geta farið fram á að framleiðandi veiti upplýsingar um allar áætlaðar samþykkisprófanir í verksmiðju sem skipta máli fyrir prófun í viðurvist vitnis.

Ef niðurstaðan sem um getur í c-lið 2. liðar fæst ekki telst tegundin og allar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar. Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun liggur fyrir um að tegundin uppfylli ekki kröfurnar.“

Eftirfarandi kemur í stað 3. liðar:

„3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a-, b- eða c-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.“

4) Í IV. viðauka breytist c-liður sem hér segir:

„c) Meðalstórir aflspennar með myndlausum stálkjarna: A_o-50%, A_k“.

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/1782 **2020/EES/73/06**

frá 1. október 2019

um kröfur varðandi visthönnun ytri aflgjafa samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB og um niðurfellingu á reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 278/2009 (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af 114. gr. sáttmálans 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.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Samkvæmt tilskipun 2009/125/EB ætti framkvæmdastjórnin að setja kröfur varðandi visthönnun að því er varðar orkutengdar vörur sem eru umtalsverður hluti sölu og viðskipta í Sambandinu, sem hafa veruleg umhverfisáhrif og búa yfir miklum möguleikum á að draga úr umhverfisáhrifum með vali á hönnun, án þess að það hafi í för með sér óhóflegan kostnað.

2) Í orðsendingu framkvæmdastjórnarinnar COM(2016) 773 ([2]) (vinnuáætlun um visthönnun), sem framkvæmdastjórnin tók saman við beitingu 1. mgr. 16. gr. tilskipunar 2009/125/EB, eru tilgreind forgangsverkefni samkvæmt rammanum um visthönnun og orkumerkingar fyrir tímabilið 2016-2019. Í vinnuáætluninni um visthönnun eru tilgreindir orkutengdir vöruflokkar sem teljast forgangsmál í tengslum við framkvæmd undirbúningsrannsókna og endanlega samþykkt framkvæmdarráðstafana, sem og endurskoðun á reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 278/2009 ([3]).

3) Áætlað er að aðgerðir vinnuáætlunarinnar um visthönnun gætu skilað endanlegum árlegum orkusparnaði sem nemur meira en 260 TWh fyrir árið 2030, sem jafngildir því að dregið sé úr losun gróðurhúsalofttegunda sem nemur u.þ.b. 100 milljón tonnum. Ytri aflgjafar eru einn af þeim vöruflokkum sem eru tilgreindir í vinnuáætluninni.

4) Í reglugerð (EB) nr. 278/2009 setti framkvæmdastjórnin fram kröfur varðandi visthönnun ytri aflgjafa. Samkvæmt þessari reglugerð ætti framkvæmdastjórnin að endurskoða reglugerðina í ljósi tækniframfara.

5) Framkvæmdastjórnin hefur endurskoðað reglugerð (EB) nr. 278/2009 og gert tækni-, umhverfis- og efnahagsgreiningu á ytri aflgjöfum sem og greiningu á raunverulegri hegðun notenda. Endurskoðunin fór fram í nánu samstarfi við hagsmunaaðila og hlutaðeigandi aðila frá Sambandinu og þriðju löndum. Niðurstöður endurskoðunarinnar voru gerðar opinberar og kynntar á samráðsvettvanginum um visthönnun, sem komið var á fót skv. 18. gr. tilskipunar 2009/125/EB.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 272, 25.10.2019, bls. 95. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 130/2020 frá 25. september 2020 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) og IV. viðauka (Orka) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB L 285, 31.10.2009, bls. 10.

([2]) Orðsending framkvæmdastjórnarinnar, vinnuáætlun um visthönnun 2016-2019, COM(2016) 773 lokagerð, 30.11.2016.

([3]) 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).

6) Rannsóknin í tengslum við endurskoðunina sýnir að ytri aflgjafar eru settir á markað í Sambandinu í miklu magni og lýsir þeim ávinning sem hlýst af því að uppfæra kröfur varðandi visthönnun og aðlaga þær að tækniframförum.

7) Ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu, sem falla ekki undir reglugerð (EB) nr. 278/2009, eru í síauknum mæli settir á markað í Sambandinu. Þeir ættu því að falla undir gildissvið reglugerðarinnar til að tryggja frekari orkusparnað og jöfn samkeppnisskilyrði.

8) Rétt þykir að ytri aflgjafar, sem aðlaga útgangsspennu sína að meginálaginu, falli áfram undir gildissvið reglugerðarinnar.

9) Kröfur varðandi visthönnun ættu að samræma orkunotkun ytri aflgjafa og greiða þannig fyrir starfsemi innri markaðarins. Þær ættu einnig að bæta umhverfisárangur ytri aflgjafa. Talið er að hugsanlegur árlegur orkusparnaður geti verið um 4,3 TWh fyrir árið 2030, sem samsvarar 1,45 milljónum tonna af koltvísýringsígildum, samanborið við aðstæður þar sem engar frekari ráðstafanir eru gerðar.

10) Mæla ætti viðeigandi mæliþætti vara með áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum. Þessar mæliaðferðir ættu að taka tillit til viðurkenndra mæliaðferða sem byggja á nýjustu og fullkomnustu tækni og, þar sem þeir liggja fyrir, samhæfðra staðla sem samþykktir hafa verið af evrópskum staðlastofnunum, sem taldar eru upp í I. viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1025/2012 ([4]).

11) Í samræmi við 8. gr. tilskipunar 2009/125/EB ætti í þessari reglugerð að tilgreina gildandi aðferðir við samræmismat.

12) Til að auðvelda eftirlit með að kröfur séu uppfylltar ættu framleiðendur, innflytjendur eða viðurkenndir fulltrúar að veita upplýsingarnar sem tilgreindar eru í tæknigögnunum sem um getur í IV. og V. viðauka við tilskipun 2009/125/EB, að því marki sem þær tengjast kröfunum sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð.

13) Til viðbótar við þær lagalega bindandi kröfur sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð ætti, í samræmi við 2. lið 3. hluta I. viðauka tilskipunar 2009/125/EB, að tilgreina viðmiðanir fyrir bestu, fáanlegu tækni til að tryggja mikið framboð og greiðan aðgang að upplýsingum um vistvænleika á vistferli vara sem falla undir þessa reglugerð.

14) Í endurskoðun á þessari reglugerð ætti að meta hversu viðeigandi og skilvirk ákvæði hennar eru til að uppfylla markmið hennar. Endurskoðunin ætti að fara fram þegar öllum ákvæðum hefur verið hrint í framkvæmd og þau hafa haft merkjanleg áhrif á markaðinn.

15) Því ætti að fella reglugerð (EB) nr. 278/2009 úr gildi.

16) 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.

Efni og gildissvið

1. Með þessari reglugerð eru settar kröfur varðandi visthönnun svo unnt sé að setja á markað eða taka í notkun ytri aflgjafa.

2. Þessi reglugerð gildir ekki um:

a) spennubreyta,

b) órjúfanlega aflgjafa,

c) hleðslutæki fyrir rafhlöður sem eru ekki aflgjafar,

([4]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1025/2012 frá 25. október 2012 um evrópska stöðlun og breytingu á tilskipunum ráðsins 89/686/EBE og 93/15/EBE og tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 94/9/EB, 94/25/EB, 95/16/EB, 97/23/EB, 98/34/EB, 2004/22/EB, 2007/23/EB, 2009/23/EB og 2009/105/EB og niðurfellingu á ákvörðun ráðsins 87/95/EBE og ákvörðun Evrópuþingsins og ráðsins nr. 1673/2006/EB (Stjtíð. ESB L 316, 14.11.2012, bls. 12).

d) straumbreyta fyrir lýsingu,

e) ytri aflgjafa fyrir lækningatæki,

f) virka íðnetsaflinnspýta (e. *active Power over Ethernet injectors*),

g) hleðslukvíar fyrir sjálfstýrð tæki,

h) ytri aflgjafa, sem settir eru á markað fyrir 1. apríl 2025 eingöngu til nota sem aukabúnaður eða varahlutir fyrir sams konar ytri aflgjafa, sem settur var á markað fyrir 1. apríl 2020, að því tilskildu að textinn „Ytri aflgjafi sem skal eingöngu notaður sem varahlutur fyrir“ komi skýrt fram á aukabúnaðinum, varahlutnum eða umbúðunum sem og fyrir hvaða vöru(r) sem valda meginálaginu hann er ætlaður til notkunar með.

2. gr.

Skilgreiningar

Í þessari reglugerð er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

1) „ytri aflgjafi“: búnaður sem uppfyllir allar eftirfarandi viðmiðanir:

   a) hann er hannaður til að breyta aflinntaki með riðstraumi (AC) frá rafkerfinu í einn eða fleiri jafnstrauma (DC) eða riðstrauma með lægri útgangsspennu,

   b) hann er notaður með einu eða fleiri aðskildum tækjum sem valda meginálaginu,

   c) hann er í sérstöku hylki sem er aðskilið frá tækinu eða tækjunum sem valda meginálaginu,

   d) hann er tengdur við tækið eða tækin sem valda meginálaginu með lausum eða fasttengdum karl-/kventengli, kapli, snúru eða annars konar leiðslu,

   e) hann er með málútafl (e. *nameplace output power*) sem fer ekki yfir 250 W og

   f) hann er notaður með raf- og rafeindatækjum til heimilis- og skrifstofunota sem eru skráð í I. viðauka,

2) „ytri lágspennuaflgjafi“: ytri aflgjafi með málútgangsspennu (e. *nameplate output voltage*) sem er minni en 6 volt og málútstraum (e. *nameplate output current*) sem er 550 millíamper eða hærri,

3) „ytri aflgjafi með fleiri en eina útgangsspennu“: ytri aflgjafi sem getur breytt innafli með riðstraumi frá rafkerfinu samtímis í fleiri en einn jafnstraum eða riðstraum með lægri útgangsspennu,

4) „spennubreytir“: búnaður sem umbreytir straumi með 230 volta spennu frá rafkerfinu í straum með 110 volta spennu og með samskonar eiginleika og inngangsstraumur frá rafkerfinu,

5) „órjúfanlegur aflgjafi“: búnaður sem sér sjálfvirkt fyrir varaafli ef spenna raforku frá rafkerfinu lækkar niður fyrir viðunandi mörk,

6) „hleðslutæki fyrir rafhlöður“: búnaður sem tengist lausri rafhlöðu beint í útgangstengi,

7) „spennubreytir fyrir lýsingu“: ytri aflgjafi sem notaður er með ljósgjöfum með mjög lágri spennu,

8) „virkur íðnetsaflinnspýtir“ (e. *active Power over Ethernet injector*): búnaður sem umbreytir inntakinu frá rafkerfinu í lægri jafnstraumsútgangsspennu, er með eitt eða fleiri inngangstengi fyrir íðnet og/eða eitt eða fleiri útgangstengi fyrir íðnet, gefur afl til eins eða nokkurra tækja sem tengd eru við útgangstengi(n) fyrir íðnet, og gefur aðeins málspennu við útgangstengi(n) þegar staðlað ferli greinir samrýmanleg tæki,

9) „hleðslukví fyrir sjálfstýrð tæki“: búnaður sem tæki, sem gengur fyrir rafhlöðum og framkvæmir verkefni sem krefjast þess að tækið hreyfist án íhlutunar notanda, er sett í til hleðslu og sem getur stýrt sjálfstæðum hreyfingum tækisins,

10) „rafveita“: raforkudreifing frá dreifikerfinu við 230 (± 10%) volta riðstraum við 50 Hz,

11) „upplýsingatæknibúnaður“: allur búnaður sem er fyrst og fremst ætlaður til þess að færa inn, vista, birta, endurheimta, senda eða vinna gögn eða fjarskiptaboð, eða til að miðla eða stýra gögnum eða fjarskiptaboðum, og er búinn einu eða fleiri tengjum sem eru venjulega notuð við flutning á upplýsingum,

12) „heimili“: umhverfi þar sem gera má ráð fyrir að útvarps- og sjónvarpsviðtæki séu í notkun innan tíu metra frá þeim búnaði sem um er að ræða,

13) „málútafl“ (e. *nameplate output power*) (P_O): hámarksútafl sem framleiðandi tilgreinir,

14) „í lausagangi“: ástand þar sem inngangstengi ytri aflgjafa er í sambandi við rafkerfið en útgangstengið er ekki tengt búnaði sem veldur meginálaginu,

15) „virkur hamur“: ástand þar sem tengi ytri aflgjafa er í sambandi við rafkerfið og útgangstengið er tengt búnaði sem veldur meginálaginu,

16) „nýtni í virkum ham“: hlutfall afls sem ytri aflgjafi framleiðir í virkum ham samanborið við það inntaksafl sem nauðsynlegt er til að framleiða það,

17) „meðalnýtni við álag“: meðaltal nýtni í virkum ham við 25%, 50%, 75% og 100% af málútafli,

18) „sambærileg tegund“: tegund með sömu tæknilegu eiginleika sem máli skipta hvað varðar tækniupplýsingar sem veita skal, en er sett á markað eða tekin í notkun af sama framleiðanda, innflytjanda eða viðurkennda fulltrúa sem önnur tegund með annað tegundarauðkenni,

19) „tegundarauðkenni“: kóði, venjulega alstafa, sem greinir tiltekna vörutegund frá öðrum tegundum með sama vörumerki eða nafni framleiðanda, innflytjanda eða viðurkennds fulltrúa.

3. gr.

Kröfur varðandi visthönnun

Kröfurnar varðandi visthönnun, sem settar eru fram í II. viðauka, skulu gilda frá þeim dagsetningum sem þar eru tilgreindar.

4. gr.

Samræmismat

1. Aðferðin við samræmismat, sem um getur í 8. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skal vera innra hönnunareftirlitskerfið, sem sett er fram í IV. viðauka við þá tilskipun, eða stjórnunarkerfið, sem sett er fram í V. viðauka við þá tilskipun.

2. Að því er varðar samræmismat, skv. 8. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu tæknigögnin innihalda yfirlýst gildi mæliþáttanna sem tilgreindir eru í c-lið 2. liðar II. viðauka.

3. Þegar upplýsinganna í tæknigögnum tiltekinnar tegundar hefur verið aflað:

a) á grundvelli tegundar með sömu tæknilegu eiginleika sem máli skipta hvað varðar tækniupplýsingarnar sem veita skal, en er framleidd af öðrum framleiðanda eða

b) með útreikningi á grundvelli hönnunar eða með framreikningi á grundvelli annarrar tegundar frá sama eða öðrum framleiðanda, eða með báðum þessum aðferðum,

skulu tæknigögnin innihalda upplýsingar og niðurstöður sem varða slíka útreikninga, hvaða mat framleiðendur hafa gert til að staðfesta nákvæmni útreikninganna sem gerðir hafa verið og þar sem við á, yfirlýsingu sem staðfestir að tegundir frá mismunandi framleiðendum eru eins.

Tæknigögnin skulu innihalda skrá yfir jafngildar tegundir, þ.m.t. tegundarauðkenni.

5. gr.

Sannprófunaraðferð vegna markaðseftirlits

Yfirvöld aðildarríkja skulu beita sannprófunaraðferðinni sem mælt er fyrir um í III. viðauka við markaðseftirlit það sem um getur í 2. lið 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB.

6. gr.

Viðmiðanir

Viðmiðanir fyrir vistvænustu vörurnar og tæknina á markaði við gildistöku þessarar reglugerðar eru settar fram í IV. viðauka.

7. gr.

Endurskoðun

Framkvæmdastjórnin skal endurskoða þessa reglugerð í ljósi tækniframfara og kynna niðurstöður þessarar endurskoðunar, þ.m.t., ef við á, drög að tillögu um endurskoðun, á samráðsvettvanginum eigi síðar en 14. nóvember 2022.

Í þessari endurskoðun skal einkum meta: hagkvæmni þess að setja kröfu varðandi lágmarksorkunýtni við 10% álag, möguleika á að fella undir gildissvið reglugerðarinnar þráðlaus hleðslutæki, virka íðnetsaflinnspýta og ytri aflgjafa sem eru notaðir með raf- og rafeindatækjum til heimilis- og skrifstofunota sem eru ekki skráðir í I. viðauka, og möguleika á að fella inn kröfur til stuðnings markmiðum hringrásarhagkerfisins, þ.m.t. samvirkni.

8. gr.

Niðurfelling

Reglugerð (EB) nr. 278/2009 er felld úr gildi frá og með 1. apríl 2020.

9. gr.

Gildistaka og framkvæmd

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

Hún kemur til framkvæmda frá og með 1. apríl 2020.

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

Gjört í Brussel 1. október 2019.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

I. VIÐAUKI

Skrá yfir raf- og rafeindatæki til heimilis- og skrifstofunota.

1. Heimilistæki:
   - tæki til eldunar og annarrar vinnslu matvæla, til að útbúa drykkjarföng, til að opna eða innsigla ílát eða umbúðir, til þrifa og viðhalds á fatnaði,
   - hárskurðartæki, hárþurrkur, tæki til hármeðhöndlunar, rafmagnstannburstar, rakvélar, nuddtæki og önnur tæki til líkamsumhirðu,
   - rafmagnshnífar,
   - vogir,
   - klukkur, armbandsúr og búnaður til að mæla, gefa til kynna eða skrá tíma.
2. Upplýsingatæknibúnaður, þ.m.t. ljósritunar- og prentunarbúnaður, og aðgangskassar, sem fyrst og fremst er ætlaður til notkunar á heimilum.
3. Neytendabúnaður:
   - útvarpstæki,
   - myndbandsupptökuvélar,
   - myndbandsupptökutæki,
   - hi-fi-upptökutæki,
   - magnarar,
   - heimabíókerfi,
   - sjónvörp,
   - hljóðfæri,
   - annar búnaður sem er notaður til hljóð- eða myndupptöku eða -flutnings, þ.m.t. merki eða annars konar tækni við dreifingu hljóðs og myndar en með fjarskiptum.
4. Rafmagns- og rafeindaleikföng, tómstunda- og íþróttabúnaður:
   - rafmagnsjárnbrautir eða -bílabrautir,
   - leikjatölvur, þ.m.t. handleikjatölvur,
   - íþróttabúnaður með raf- eða rafeindaíhlutum,
   - önnur leikföng, tómstunda- og íþróttabúnaður.

II. VIÐAUKI

Kröfur varðandi visthönnun ytri aflgjafa

1. Orkunýtnikröfur:

a) Frá 1. apríl 2020 skal aflþörf í lausagangi ekki fara yfir eftirfarandi gildi:

	Ytri aflgjafar (AC-AC), nema ytri lágspennu-aflgjafar og ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu	Ytri aflgjafar (AC-DC), nema ytri lágspennu-aflgjafar og ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu	Ytri lágspennuaflgjafar	Ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu
$P_O \leq 49{,}0$ W	0,21 W	0,10 W	0,10 W	0,30 W
$P_O > 49{,}0$ W	0,21 W	0,21 W	0,21 W	0,30 W

b) Frá 1. apríl 2020 skal meðalnýtni við álag ekki vera undir eftirfarandi gildum:

	Ytri aflgjafar (AC-AC), nema ytri lágspennu-aflgjafar og ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu	Ytri aflgjafar (AC-DC), nema ytri lágspennu-aflgjafar og ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu	Ytri lágspennuaflgjafar	Ytri aflgjafar með fleiri en eina útgangsspennu
$P_O \leq 1{,}0$ W	$0{,}5 \times P_O/1W + 0{,}160$	$0{,}5 \times P_O/1W + 0{,}160$	$0{,}517 \times P_O/1W + 0{,}087$	$0{,}497 \times P_O/1W + 0{,}067$
1 W < $P_O \leq 49{,}0$ W	$0{,}071 \times \ln(P_O/1W) - 0{,}0014 \times P_O/1W + 0{,}67$	$0{,}071 \times \ln(P_O/1W) - 0{,}0014 \times P_O/1W + 0{,}67$	$0{,}0834 \times \ln(P_O/1W) - 0{,}0014 \times P_O/1W + 0{,}609$	$0{,}075 \times \ln(P_O/1W) + 0{,}561$
$P_O > 49{,}0$ W	0,880	0,880	0,870	0,860

2. Kröfur um upplýsingar:

a) Frá 1. apríl 2020 skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram á merkispjaldinu:

Upplýsingar á merkispjaldi	Gildi og nákvæmni	Eining	Athugasemdir
Útafl	X,X	W	Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal gefa upp öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) úr hverri mælingu.
Útgangsspenna	X,X	V	Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal gefa upp öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) úr hverri mælingu.
Útstraumur	X,X	A	Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal gefa upp öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) úr hverri mælingu.

b) Frá 1. apríl 2020 skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram í notendahandbókum fyrir endanlega notendur (eftir atvikum) og á opnum vefsetrum framleiðenda, innflytjenda eða viðurkenndra fulltrúa í þeirri röð sem sett er fram hér á eftir:

Birtar upplýsingar	Gildi og nákvæmni	Eining	Athugasemdir
Heiti eða vörumerki framleiðanda, skráningarnúmer fyrirtækis og heimilisfang	-	-	-
Tegundarauðkenni	-	-	-
Inngangsspenna	X	V	Tilgreint af framleiðanda. Skal vera gildi eða svið.
Inngangstíðni (riðstraumur)	X	Hz	Tilgreint af framleiðanda. Skal vera gildi eða svið.
Útgangsspenna	X,X	V	Málútgangsspenna. Tilgreina hvort um riðstraum eða jafnstraum sé að ræða. Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal birta öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) fyrir hverja mælingu.
Útstraumur	X,X	A	Málútstraumur. Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal birta öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) fyrir hverja mælingu.
Útafl	X,X	W	Málútafl. Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunverulegur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal birta öll tiltæk gögn (útgangsspenna — útstraumur — útafl) fyrir hverja mælingu.
Meðalnýtni við álag	X,X	%	Uppgefin af framleiðanda byggt á gildinu sem reiknað er sem meðaltal af nýtni við álagsskilyrði 1-4. Í tilvikum þar sem gefin eru upp mörg meðaltöl fyrir meðalnýtni við álag fyrir mismunandi útgangsspennu sem er tiltæk við álagsskilyrði 1, skal gildið, sem gefið er út, vera meðaltalið fyrir meðalnýtni við álag sem gefið er upp fyrir lægstu útgangsspennuna.
Nýtni við lítið álag (10%)	X,X	%	Uppgefin af framleiðanda byggt á gildinu sem reiknað er við álagsskilyrði 5. Ytri aflgjafar með málútafl sem er 10 W eða minna skulu undanþegnir þessari kröfu. Í tilvikum þar sem gefin eru upp mörg meðaltöl fyrir meðalnýtni við álag eru gefin upp fyrir mismunandi útgangsspennu sem er tiltæk við álagsskilyrði 1, skal gildið, sem gefið er út, vera það gildi sem gefið er upp fyrir lægstu útgangsspennuna.
Aflnotkun í lausagangi	X,XX	W	Uppgefin af framleiðanda byggt á gildinu sem mælt er við álagsskilyrði 6.

Álagsskilyrði samsvara eftirfarandi:

Hlutfall málútstraums	
Álagsskilyrði 1	100% ± 2%
Álagsskilyrði 2	75% ± 2%
Álagsskilyrði 3	50% ± 2%
Álagsskilyrði 4	25% ± 2%
Álagsskilyrði 5	10% ± 1%
Álagsskilyrði 6	0% (í lausagangi)

c) Tæknigögnin fyrir samræmismat skv. 4. gr. skulu innihalda eftirfarandi þætti frá 1. apríl 2020:

1) Fyrir ytri aflgjafa með málútafl sem er 10 vött eða meira:

Tilkynnt stærð	Lýsing
Virkt gildi útstraums (mA)	Mælt við álagsskilyrði 1-5
Virk úttaksspenna (V)	
Virkt útafl (W)	
Virk inntaksspenna (V)	Mælt við álagsskilyrði 1-6
Virkt gildi inntaksafls (W)	
Heildaryfirsveiflubjögun inngangsstraumsins	
Aflstuðull	
Aflnotkun (W)	Reiknað við álagsskilyrði 1-5, mælt við álagsskilyrði 6
Nýtni í virkum ham	Reiknuð við álagsskilyrði 1-5
Meðalnýtni við álag	Meðaltal fyrir nýtni við álagsskilyrði 1-4

Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunlægur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal gefa upp viðeigandi tilkynntar stærðir fyrir hverja mælingu.

Viðkomandi álagsskilyrði eru sett fram í b-lið 2. liðar.

2) Fyrir ytri aflgjafa með málútafl sem er 10 vött eða minna:

Tilkynnt stærð	Lýsing
Virkt gildi útstraums (mA)	Mælt við álagsskilyrði 1-4
Virk úttaksspenna (V)	
Virkt útafl (W)	
Virk inntaksspenna (V)	Mælt við álagsskilyrði 1-4 og 6
Virkt gildi inntaksafls (W)	
Heildaryfirsveiflubjögun inngangsstraumsins	
Aflstuðull	
Aflnotkun (W)	Reiknað við álagsskilyrði 1-4, mælt við álagsskilyrði 6
Nýtni í virkum ham	Reiknuð við álagsskilyrði 1-4

Tilkynnt stærð	Lýsing
Meðalnýtni við álag	Meðaltal fyrir nýtni við álagsskilyrði 1-4

Í tilvikum þar sem fleiri en einn raunlægur útgangur eða fleiri en ein útgangsspenna við álagsskilyrði 1 er mæld, skal gefa upp viðeigandi tilkynntar stærðir fyrir hverja mælingu.

Viðkomandi álagsskilyrði eru sett fram í b-lið 2. liðar.

3. Mælingar og útreikningar

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 sem taka tillit til almennt viðurkenndra aðferða sem byggjast á nýjustu tækni.

III. VIÐAUKI

Sannprófunaraðferð vegna markaðseftirlits

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

Þegar yfirvöld aðildarríkjanna sannreyna að vörutegund uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu þau beita eftirfarandi aðferð með tilliti til þeirra krafna sem um getur í þessum viðauka:

1. Yfirvöld aðildarríkisins skulu framkvæma sannprófun á stakri einingu af tegundinni.
2. Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef:
   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, eru ekki hagstæðari fyrir framleiðandann, innflytjandann eða viðurkenndan fulltrúa en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið í téðum lið, og
   b) yfirlýstu gildin uppfylla allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn, innflytjandinn eða viðurkenndi fulltrúinn birtir, innihalda ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann, innflytjandann eða viðurkennda fulltrúann en yfirlýstu gildin og
   c) ákvörðuð gildi (þ.e.a.s. gildi fyrir viðeigandi mæliþætti, eins og þau mælast við prófanir, og þau gildi sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) uppfylla viðkomandi vikmörk við sannprófun, sem tilgreind eru í töflu 1, á þeim tíma sem yfirvöld aðildarríkisins prófa einingu af tegundinni, og
   d) hún uppfyllir kröfurnar um upplýsingar í 2. lið II. viðauka þegar yfirvöld aðildarríkisins prófa einingu af tegundinni.
3. Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a-, b- eða d-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.
4. Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkisins 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 við sannprófun sem eru tilgreind í töflu 1.
6. Ef niðurstaðan sem um getur í 5. lið fæst ekki telst tegundin og allar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.
7. Yfirvöld aðildarríkjanna skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun liggur fyrir um að tegundin uppfylli ekki kröfurnar í 3. eða 6. lið.

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

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu eingöngu beita vikmörkunum við sannprófanir, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, í tengslum við kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Að því er varðar mæliþættina í töflu 1 skal ekki beita öðrum vikmörkum á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða í einhverri annarri mæliaðferð.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	*Vikmörk við sannprófun*
Í lausagangi	Ákvarðað gildi (*) skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,01 W.
Nýtni í virkum ham við hvert viðeigandi álagsskilyrði	Ákvarðað gildi (*) skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Meðalnýtni við álag	Ákvarðað gildi (*) skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.

(*) Ef þrjár viðbótareiningar eru prófaðar, eins og mælt er fyrir um í 4. lið, er ákvarðað gildi meðaltal gildanna sem ákvörðuð eru fyrir þessar þrjár viðbótareiningar.

IV. VIÐAUKI

Viðmiðanir

Við gildistöku þessarar reglugerðar var besta, fáanlega tækni á markaðinum fyrir ytri aflgjafa að því er varðar aflnotkun í lausagangi og meðalnýtni við álag skilgreind sem hér segir:

a) Í lausagangi:

Hægt er að áætla minnstu aflnotkun ytri aflgjafa í lausagangi sem hér segir:

— 0,002 vött, fyrir $P_O \leq 49{,}0$ vött,

— 0,010 vött, fyrir $P_O > 49{,}0$ vött.

b) Meðalnýtni við álag:

Hægt er að áætla bestu fyrirliggjandi meðalnýtni ytri aflgjafa við álag sem hér segir:

— 0,767, fyrir $P_O \leq 1{,}0$ vatt,

— 0,905, fyrir $1{,}0 \text{ vatt} < P_O \leq 49{,}0$ vött,

— 0,962, fyrir $P_O > 49{,}0$ vött.

FRAMSELD REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/856 **2020/EES/73/07**

frá 26. febrúar 2019

um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB að því er varðar starfsemi nýsköpunarsjóðsins (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB frá 13. október 2003 um að koma á fót kerfi fyrir viðskipti með heimildir til losunar gróðurhúsalofttegunda innan Bandalagsins og um breytingu á tilskipun ráðsins 96/61/EB ([1]), einkum fjórðu undirgrein 8. mgr. 10. gr. a,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Setja ætti ítarlegar reglur um starfsemi nýsköpunarsjóðsins með tilliti til þess lærdóms sem var dreginn af NER300-áætluninni sem komið var á fót samkvæmt tilskipun 2003/87/EB og framkvæmd á grundvelli ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 2010/670/ESB ([2]) og einkum ætti að taka tillit til niðurstaðna í skýrslu endurskoðunarréttar Evrópusambandsins ([3]).

2) Í því skyni að bæta upp minni arðsemi og meiri tæknilega áhættu af aðstoðarhæfum verkefnum samanborið við hefðbundna tækni ætti að veita verulegan hluta af fjármögnun nýsköpunarsjóðsins í formi styrks. Þess vegna ætti að setja ítarlegar reglur um greiðslu styrkja.

3) Þar eð áhætta og arðsemi af aðstoðarhæfum verkefnum geta verið mismunandi milli geira og starfsemi þessara verkefna og geta einnig þróast með tímanum þykir rétt að veita þann möguleika að hluti af stuðningnum frá nýsköpunarsjóðnum komi í gegnum framlag til blendingsstarfsemi (e. *blending operations*) innan ramma stuðningsfjármögnunarleiðar Sambandsins, sem og í öðru formi sem kveðið er á um í reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) 2018/1046 ([4]) („fjárhagsreglugerðin“).

4) Rétt þykir að líta á mismuninn milli heildarkostnaðar við aðstoðarhæft verkefni og heildarkostnaðar við sambærilegt verkefni, þar sem hefðbundin tækni er notuð, sem viðkomandi kostnað að því er varðar fjármögnun gegnum nýsköpunarsjóðinn. Í því skyni að komast hjá óhóflegu stjórnsýsluálagi vegna minni háttar verkefna og bregðast við sérstökum vandkvæðum við að fá fjármögnun fyrir þau ætti þó viðkomandi kostnaður við minni háttar verkefni að vera heildarkostnaður fjárfestingarútgjalda fyrir slíkt verkefni.

5) Með það fyrir augum að gera fullnægjandi fjármagn tímanlega aðgengilegt fyrir aðstoðarhæf verkefni ætti greiðsla styrkja að byggjast á því að ná tilteknum áföngum. Að því er varðar öll verkefni ættu þessir áfangar að taka til loka fjármögnunar (e. *financial close*) og upphafs starfrækslu. Þar eð sum verkefni gætu þurft að fá stuðninginn greiddan á öðrum tímapunkti þykir rétt að kveða á um þann möguleika að ákvarða viðbótaráfanga í samningsskjölunum.

6) Til að auka líkurnar á árangri af verkefnunum ætti að fastsetja þann möguleika að hluti af styrknum verði greiddur áður en starfræksla verkefnis hefst. Að meginreglu til ætti greiðsla styrkja að hefjast við lok fjármögnunar og halda áfram meðan þróun og starfræksla verkefnisins stendur yfir.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 140, 28.5.2019, bls. 6. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 143/2020 frá 25. september 2020 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn (bíður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB L 275, 25.10.2003, bls. 32.

([2]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2010/670/ESB frá 3. nóvember 2010 um viðmiðanir og ráðstafanir vegna fjármögnunar sýniverkefna í viðskiptaskyni, sem miða að umhverfisvænni föngun og geymslu CO 2 í jörðu, og sýniverkefna er varða nýskapandi tækni á sviði endurnýjanlegrar orku innan kerfisins fyrir viðskipti með heimildir til losunar gróðurhúsalofttegunda innan Bandalagsins sem komið var á með tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB (Stjtíð. ESB L 290, 6.11.2010, bls. 39).

([3]) Sérstök skýrsla nr. 24/2018 frá 5. september 2018: „Demonstrating carbon capture and storage and innovative renewables at commercial scale in the EU: intended progress not achieved in the past decade“ (Kynning á föngun og geymslu kolefnis og nýstárlegum og endurnýjanlegum orkugjöfum í ábataskyni í ESB: áætlaður árangur náðist ekki á síðasta áratug), aðgengileg á vefsetri Endurskoðunarréttarins: https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR18_24/SR_CCS_EN.pdf

([4]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) 2018/1046 frá 18. júlí 2018 um fjárhagsreglur sem gilda um fjárlög Sambandsins, breytingu á reglugerðum (ESB) nr. 1296/2013, (ESB) nr. 1301/2013, (ESB) nr. 1303/2013, (ESB) nr. 1304/2013, (ESB) nr. 1309/2013, (ESB) nr. 1316/2013, (ESB) nr. 223/2014, (ESB) nr. 283/2014, og ákvörðun nr. 541/2014/ESB og niðurfellingu reglugerðar (ESB, KBE) nr. 966/2012 (Stjtíð. ESB L 193, 30.7.2018, bls. 1).

7) Meirihluti stuðningsins frá nýsköpunarsjóðnum ætti að vera háður þeirri losun gróðurhúsalofttegunda sem staðfest hefur verið að komist hafi verið hjá. Verulega ófullnægjandi frammistaða, að því er varðar losun gróðurhúsalofttegunda sem áætlað er að komast hjá, ætti því að leiða til skerðingar á stuðningi ásamt endurheimt fjárhæðar í samræmi við það. Kerfi til skerðingar og endurheimtar ætti þó að vera nógu sveigjanlegt til að taka tillit til nýsköpunareiginleika verkefna sem njóta stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum.

8) Veita ætti styrki úr nýsköpunarsjóðnum eftir valferli á samkeppnisgrundvelli með auglýsingum eftir tillögum. Í því skyni að draga úr stjórnsýsluálagi á talsmenn verkefna ætti að koma á málsmeðferð á tveimur stigum við umsókn sem samanstendur af yfirlýsingu um áhuga og fullgerðri umsókn.

9) Meta ætti verkefni, sem sótt er um stuðning fyrir frá nýsköpunarsjóðnum, á grundvelli eigindlegra og megindlegra viðmiðana. Samsetning slíkra viðmiðana ætti að tryggja að mat á verkefni sé heildstætt með tilliti til tæknilegra og viðskiptalegra möguleika þess. Til að tryggja að val á verkefnum sé sanngjarnt og byggist á verðleika ætti að velja þau á grundvelli sömu valviðmiðana en meta þau og forgangsraða fyrst með hliðsjón af öðrum verkefnum í sama geira og síðan með hliðsjón af verkefnum þvert á geira.

10) Ef áætlanagerð, viðskiptalíkan og fjárhagsskipan verkefna og rekstrarform þeirra að lögum virðast ekki nógu langt á veg komin, einkum í ljósi hugsanlegs skorts á stuðningi hlutaðeigandi aðildarríkja eða á nauðsynlegum landsleyfum, ætti ekki að velja þau til að fá stuðning frá nýsköpunarsjóðnum. Slík verkefni geta hins vegar lofað góðu. Þess vegna ætti að mæla fyrir um möguleikann á því að veita slíkum verkefnum þróunaraðstoð. Þróunaraðstoð til verkefnis ætti einkum að gagnast minni háttar verkefnum og verkefnum í aðildarríkjum, þar sem tekjur eru lágar, til að hjálpa við að ná landfræðilega jafnri dreifingu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum.

11) Mikilvægt er að ná landfræðilega jafnri dreifingu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum. Til að koma í veg fyrir þær aðstæður að sum aðildarríki fái ekki nægan stuðning ætti að mæla fyrir um þann möguleika að fastsetja viðbótarvalviðmiðanir sem miða að því að ná landfræðilega jafnri dreifingu í næstu eða síðari auglýsingum eftir tillögum.

12) Framkvæmdastjórnin ætti að tryggja að nýsköpunarsjóðnum verði komið til framkvæmda. Framkvæmdastjórninni ætti þó að vera gert kleift að fela framkvæmdaraðilum eitthvað af framkvæmdaraðgerðunum, s.s. skipulagningu auglýsingar eftir tillögum, forval á verkefnum eða stjórnun samninga um styrki.

13) Tekjum nýsköpunarsjóðsins, þ.m.t. tekjur vegna losunarheimilda sem er komið í verð á sameiginlega uppboðsvettvanginum í samræmi við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1031/2012 ([5]), ætti að vera stjórnað í samræmi við markmið tilskipunar 2003/87/EB. Framkvæmdastjórnin ætti því sjálf að sinna þessu verkefni og gera ætti henni kleift að fela Fjárfestingarbanka Evrópu þetta verkefni.

14) Framkvæmdastjórnin ætti að beita mismunandi reglum með hliðsjón af aðferðinni við að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda. Þegar nýsköpunarsjóðnum er komið til framkvæmda með beinni stjórnun ættu ákvæði þessarar reglugerðar að vera í fullu samræmi við ákvæði fjárhagsreglugerðarinnar.

15) Aðildarríkin ættu að gegna mikilvægu hlutverki við að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda. Einkum ætti framkvæmdastjórnin að hafa samráð við aðildarríkin um helstu ákvarðanir um framkvæmd sem og um þróun nýsköpunarsjóðsins.

16) Koma ætti nýsköpunarsjóðnum í framkvæmd í samræmi við meginreglur um trausta fjármálastjórnun eins og mælt er fyrir um í fjárhagsreglugerðinni.

17) Mæla ætti fyrir um skýrt fyrirkomulag við skýrslugjöf, ábyrgð og fjármálastjórn til að tryggja að framkvæmdastjórninni berist fullgerðar og tímanlegar upplýsingar um framvindu verkefna sem fá stuðning frá nýsköpunarsjóðnum, að aðilarnir sem stjórna nýsköpunarsjóðnum fylgi meginreglum um trausta fjármálastjórnun og að aðildarríkin séu upplýst tímanlega um að nýsköpunarsjóðnum sé komið til framkvæmda.

([5]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1031/2010 frá 12. nóvember 2010 um tímasetningu, stjórnun og aðra þætti í tengslum við uppboð á heimildum til losunar gróðurhúsalofttegunda samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB um að koma á fót kerfi fyrir viðskipti með heimildir til losunar gróðurhúsalofttegunda innan Bandalagsins (Stjtíð. ESB L 302, 18.11.2010, bls. 1).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

I. KAFLI

Almenn ákvæði

1. gr.

Efni

Í þessari reglugerð er mælt fyrir um ítarlegar reglur sem bæta við tilskipun 2003/87/EB að því er varðar:

a) rekstrarmarkmið nýsköpunarsjóðsins sem komið var á fót með 8. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB,

b) form stuðnings sem er veittur frá nýsköpunarsjóðnum,

c) málsmeðferð við umsókn um stuðning frá nýsköpunarsjóðnum,

d) málsmeðferð og viðmiðanir fyrir val á verkefni sem getur fengið stuðning frá nýsköpunarsjóðnum,

e) greiðslu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum,

f) stjórnun nýsköpunarsjóðsins,

g) skýrslugjöf, vöktun, úttekt, eftirlit og kynningu að því er varðar starfsemi nýsköpunarsjóðsins.

2. gr.

Skilgreiningar

Í þessari reglugerð er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

1) „lok fjármögnunar“: sá tímapunktur í þróunarferli verkefnisins þegar allir samningar um verkefni og fjármögnun þess hafa verið undirritaðir og öll tilskilin skilyrði í þeim hafa verið uppfyllt,

2) „upphaf starfrækslu“: sá tímapunktur í þróunarferli verkefnisins þegar allir þættir og kerfi sem eru nauðsynleg fyrir starfrækslu verkefnisins hafa verið prófuð og starfsemi, sem leiðir til þess að komist er hjá losun gróðurhúsalofttegunda á árangursríkan hátt, hefur hafist,

3) „minni háttar verkefni“: verkefni þar sem heildarfjárfestingarútgjöld eru ekki yfir 7 500 000 evrum.

3. gr.

Rekstrarmarkmið

Rekstrarmarkmið nýsköpunarsjóðsins skulu vera eftirfarandi:

a) að styðja verkefni þar sem sýnt er fram á mjög nýstárlega tækni, ferli eða vörur, sem eru nægilega langt á veg komin og hafa umtalsverða möguleika til að draga úr losun gróðurhúsalofttegunda,

b) að bjóða fjárstuðning sem er sniðinn að þörfum markaðarins og áhættulýsingu aðstoðarhæfra verkefna og laða jafnframt að frekari tekjur frá opinberum aðilum eða einkaaðilum,

c) að tryggja að tekjum nýsköpunarsjóðsins sé stjórnað í samræmi við markmið tilskipunar 2003/87/EB.

4. gr.

Form stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum

Stuðningur frá nýsköpunarsjóðnum til verkefnis getur verið í eftirfarandi formi:

a) styrkir,

b) framlög til blendingsstarfsemi samkvæmt stuðningsfjármögnunarleið Sambandsins,

c) ef nauðsyn krefur til að ná markmiðum tilskipunar 2003/87/EB, fjármögnun í einhverju því formi sem mælt er fyrir um í reglugerð (ESB, KBE) 2018/1046 (fjárhagsreglugerðin), einkum verðlaun og innkaup.

II. KAFLI

Sértæk ákvæði sem eiga við um styrki

5. gr.

Viðkomandi kostnaður

1. Að því er varðar fjórða málslið þriðju undirgreinar 8. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB skal viðkomandi kostnaður vera sá viðbótarkostnaður sem fellur á talsmann verkefnis vegna umsóknar um nýsköpunartækni sem tengist skerðingu á losun gróðurhúsalofttegunda eða að komist sé hjá henni. Viðkomandi kostnaður skal reiknaður út sem mismunurinn á milli besta mats á heildarfjárfestingarútgjöldum, hreins núvirðis rekstrarkostnaðar og ávinnings sem hlýst á tíu ára tímabili eftir að starfræksla verkefnis hefst, samanborið við niðurstöður sömu útreikninga fyrir hefðbundna framleiðslu með sömu getu með tilliti til árangursríkrar framleiðslu á viðkomandi lokaafurð.

Ef hefðbundin framleiðsla, sem um getur í fyrstu undirgrein, er ekki til skal viðkomandi kostnaður vera besta mat á heildarfjárfestingarútgjöldum og hreinu núvirði rekstrarkostnaðar og ávinnings sem hlýst á tíu ára tímabili eftir að starfræksla verkefnisins hefst.

2. Viðkomandi kostnaður við minni háttar verkefni skal vera heildarkostnaður fjárfestingarútgjalda fyrir þetta verkefni.

6. gr.

Greiðsla styrkja

1. Stuðningur frá nýsköpunarsjóðnum, í formi styrks, skal greiddur þegar fyrirframákveðnum áföngum er náð.

2. Að því er varðar öll verkefni skulu áfangarnir, sem um getur í 1. mgr., byggjast á þróunarferli verkefnisins og skulu a.m.k. vera eftirfarandi:

a) lok fjármögnunar,

b) upphaf starfrækslu.

3. Heimilt er að ákvarða sértæka viðbótaráfanga í samningsskjölunum að teknu tilliti til tækninnar sem er notuð og sértækra aðstæðna í geiranum eða geirunum þar sem hún er notuð.

4. Allt að 40% af heildarfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum, þ.m.t. þróunaraðstoð til verkefnis, til tiltekins verkefnis skulu greidd við lok fjármögnunar eða þegar tilteknum áfanga er náð fyrir lok fjármögnunar ef slíkur áfangi hefur verið ákvarðaður í samræmi við 3. mgr.

5. Að því marki sem heildarfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum til tiltekins verkefnis hefur ekki verið greidd skv. 4. mgr. skal sú fjárhæð greidd eftir lok fjármögnunar. Heimilt er að greiða hana að hluta til áður en starfræksla hefst og með árlegum afborgunum eftir að starfræksla hefst.

6. Að því er varðar 4. og 5. mgr. þessarar greinar skal heildarfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum til tiltekins verkefnis innihalda þá stuðningsfjárhæð frá nýsköpunarsjóðnum sem er veitt til viðkomandi verkefnis í formi þróunaraðstoðar til verkefnis í samræmi við 13. gr.

7. gr.

Almennar reglur um endurheimt

1. Framkvæmdastjórnin skal gera nauðsynlegar ráðstafanir til að tryggja vernd fjárhagslegra hagsmuna nýsköpunarsjóðsins við framkvæmd starfsemi sem fjármögnuð er samkvæmt þessari reglugerð með því að beita forvarnarráðstöfunum gegn svikum, spillingu og öllu öðru ólöglegu athæfi, með því að beita skilvirku eftirliti og ef í ljós koma misfellur, með því að endurheimta fjárhæðir sem hafa verið greiddar með óréttmætum hætti og, eftir því sem við á, með fjárhagslegum og stjórnsýslulegum viðurlögum sem eru skilvirk, í réttu hlutfalli við brot og letjandi.

2. Endurheimtum skal komið í framkvæmd í samræmi við fjárhagsreglugerðina.

3. Ástæður fyrir endurheimt sem og endurheimtarferlið skulu tilgreind nánar í samningsskjölunum.

8. gr.

Sérreglur um endurheimt

1. Fjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum, sem er greidd í samræmi við 5. mgr. 6. gr. eftir lok fjármögnunar, skal háð þeirri losun gróðurhúsalofttegunda sem staðfest hefur verið að komist hafi verið hjá á grundvelli ársskýrslna sem talsmaður verkefnis leggur fram fyrir tímabil sem er á bilinu þrjú til 10 ár eftir að starfræksla hefst. Í endanlegri ársskýrslu, sem talsmaður verkefnisins leggur fram, skal koma fram heildarmagn þeirrar losunar gróðurhúsalofttegunda sem komist var hjá á öllu skýrslutímabilinu.

2. Ef heildarmagn losunar gróðurhúsalofttegunda, sem komist var hjá á öllu skýrslutímabilinu, er minna en 75% af heildarmagni losunar gróðurhúsalofttegunda sem áætlað var að komast hjá skal fjárhæðin, sem er greidd eða sem á að greiða talsmanni verkefnisins í samræmi við 5. mgr. 6. gr., endurheimt hlutfallslega eða skert til samræmis.

3. Ef starfræksla verkefnis hefst ekki á fyrirframákveðnum tíma eða ef talsmanni verkefnis tekst ekki að sýna fram á að komist hafi verið í raun hjá losun gróðurhúsalofttegunda skal endurheimta fjárhæðina, sem var greidd eftir lok fjármögnunar í samræmi við 5. mgr. 6. gr., að fullu.

4. Ef aðstæðurnar, sem um getur í 2. og 3. mgr., koma upp vegna óvenjulegrar stöðu sem talsmaður verkefnisins fær ekki ráðið við og talsmaður verkefnisins sýnir fram á möguleika verkefnisins til að ná því að komast hjá losun gróðurhúsalofttegunda umfram tilkynnt magn eða ef talsmaður verkefnisins sýnir fram á að verkefnið geti leitt til verulegs ávinnings í tengslum við nýsköpun sem byggir á lítilli koltvísýringslosun er framkvæmdastjórninni heimilt að ákveða að nota ekki endurheimtarkerfin skv. 2. og 3. mgr.

5. Ástæðan fyrir endurheimt og endurheimtarferli skal tilgreind nánar í samningsskjölunum.

6. Reglurnar, sem mælt er fyrir um í 3. og 4. mgr. þessarar greinar, skulu ekki hafa ekki áhrif á almennu reglurnar um endurheimt skv. 7. gr.

9. gr.

Auglýsingar eftir tillögum

1. Talsmönnum verkefna skal boðið að sækja um stuðning frá nýsköpunarsjóðnum gegnum opnar auglýsingar eftir tillögum sem framkvæmdastjórnin stendur fyrir.

Áður en framkvæmdastjórnin samþykkir ákvörðun um að standa fyrir auglýsingu eftir tillögum skal hún hafa samráð við aðildarríkin um drög að ákvörðun.

2. Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar um að standa fyrir auglýsingum eftir tillögum skal innihalda a.m.k. eftirfarandi:

a) heildarfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltæk fyrir auglýsingu eftir tillögum,

b) hámarksfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltæk fyrir þróunaraðstoð til verkefnis,

c) tegundir verkefna sem sóst er eftir eða geirar,

d) lýsingu á málsmeðferð við umsókn og ítarlega skrá yfir upplýsingar og skjöl sem skal leggja fram á hverju stigi málsmeðferðarinnar við umsókn,

e) ítarlegar upplýsingar um valferlið, þ.m.t. aðferðafræði við úttekt og forgangsröðun,

f) ef sértækri málsmeðferð við umsókn og valferli er beitt í samræmi við 4. mgr. 10. gr. og 6. mgr. 12. gr. fyrir minni háttar verkefni: reglur um þessa sértæku málsmeðferð,

g) ef framkvæmdastjórnin hefur lagt til hliðar hluta af heildarfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltækur vegna auglýsingar eftir tillögum fyrir minni háttar verkefni: fjárhæð þess hluta,

h) ef viðbótarvalviðmiðunum, sem miða að því að ná landfræðilega jafnri dreifingu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum, er beitt í samræmi við 2. mgr. 11. gr.: þessar viðmiðanir.

10. gr.

Málsmeðferð við umsókn

1. Framkvæmdaraðili skal safna saman umsóknunum og skipuleggja málsmeðferð við umsókn á eftirfarandi tveimur stigum:

a) yfirlýsing um áhuga,

b) fullgerð umsókn.

2. Á stigi yfirlýsingar um áhuga skal þess krafist að talsmaður verkefnisins leggi fram lýsingu á meginatriðum verkefnisins, í samræmi við kröfurnar sem mælt er fyrir um í viðkomandi auglýsingu eftir tillögum, þ.m.t. lýsing á árangri af verkefninu, nýsköpunarstig og hversu langt á veg það er komið eins og nánar er tilgreint er í a-, b- og c-lið 1. mgr. 11. gr.

3. Á stigi fullgerðrar umsóknar skal þess krafist að talsmaður verkefnisins leggi fram ítarlega lýsingu á verkefninu og öll fylgiskjöl, þ.m.t. áætlun um miðlun þekkingar.

4. Nota má einfaldaða málsmeðferð við umsókn vegna minni háttar verkefna.

11. gr.

Valviðmiðanir

1. Val á verkefnum vegna stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum skal byggjast á eftirfarandi viðmiðunum:

a) árangri með tilliti til getu til að komast hjá losun gróðurhúsalofttegunda, eftir atvikum, samanborið við viðmiðanirnar sem um getur í 2. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB,

b) nýsköpunarstigi verkefnanna samanborið við nýjustu tækni,

c) hversu langt á veg verkefni er komið með tilliti til áætlanagerðar, viðskiptalíkans og fjárhagsskipanar verkefna og rekstrarforms þeirra að lögum sem og möguleikum á því að ná lokum fjármögnunar innan tilskilins tíma sem er ekki lengri en fjögur ár eftir ákvörðun um veitingu stuðnings,

d) tæknilegum og markaðslegum möguleikum til víðtækrar notkunar eða endurgerðar eða til kostnaðarlækkunar í framtíðinni,

e) hagkvæmni með tilliti til viðkomandi kostnaðar við verkefnið að frádregnu hvers konar framlagi til þessa kostnaðar frá talsmanni verkefnisins, deilt með því heildarmagni losunar gróðurhúsalofttegunda sem áætlað er að komast hjá eða orku sem á að framleiða eða geyma eða koltvísýrings sem á að geyma á fyrstu tíu árum starfrækslu.

2. Einnig má nota viðbótarviðmiðanir við val á verkefnum sem miða að því að ná landfræðilega jafnri dreifingu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum.

12. gr.

Valferli

1. Á grundvelli þeirra umsókna sem berast á stigi yfirlýsingar um áhuga skal framkvæmdaraðilinn meta, að því er varðar hvert verkefni, aðstoðarhæfið í samræmi við 8. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB. Framkvæmdaraðilinn skal síðan halda áfram við val á aðstoðarhæfum verkefnum skv. 2. og 3. mgr. þessarar greinar.

2. Á grundvelli þeirra umsókna sem berast á stigi yfirlýsingar um áhuga skal framkvæmdaraðilinn taka saman skrá yfir verkefnin sem uppfylla valviðmiðanirnar sem mælt er fyrir um í a-, b- og c-lið 1. mgr. 11. gr. og skal bjóða talsmönnum þessara verkefna að leggja fram fullgerða umsókn.

Ef framkvæmdaraðilinn kemst að þeirri niðurstöðu að verkefni uppfylli valviðmiðanirnar sem mælt er fyrir um í a- og b-lið 1. mgr. 11. gr. en uppfylli ekki viðmiðunina sem mælt er fyrir um í c-lið 1. mgr. 11. gr. skal hann meta hvort verkefnið geti mögulega uppfyllt allar valviðmiðanirnar ef það er þróað enn frekar. Ef verkefnið hefur slíka möguleika er framkvæmdaraðilanum heimilt að veita viðkomandi verkefni þróunaraðstoð til verkefnis eða, ef framkvæmdastjórnin sinnir því verki, leggja til við framkvæmdastjórnina að verkefninu verði veitt þróunaraðstoð til verkefnis.

3. Á grundvelli fullgerðrar umsóknar, sem berst í samræmi við 2. mgr. þessarar greinar, skal framkvæmdaraðilinn halda áfram úttekt og forgangsröðun verkefnis á grundvelli allra valviðmiðana sem mælt er fyrir um í 11. gr. Að því er varðar fyrrnefnda úttekt skal framkvæmdaraðilinn bera verkefnið saman við verkefni innan sama geira sem og verkefni í öðrum geirum og skal taka saman skrá yfir fyrirframvalin verkefni.

4. Senda skal framkvæmdastjórninni skrá yfir fyrirframvalin verkefni, sem um getur í 3. mgr., og, eftir atvikum, tillöguna sem um getur í annarri undirgrein 2. mgr., og skal hún innihalda a.m.k. eftirfarandi:

a) staðfestingu á að farið sé að viðmiðunum um aðstoðarhæfi og valviðmiðunum,

b) upplýsingar um úttekt á verkefni og forgangsröðun,

c) heildarkostnað við verkefnið og viðkomandi kostnað, sem um getur í 5. gr., í evrum,

d) beiðni um stuðning samtals frá nýsköpunarsjóðnum, í evrum,

e) magn losunar gróðurhúsalofttegunda sem áætlað er að komast hjá,

f) magn orku sem áætlað er að framleiða eða geyma,

g) magn koltvísýrings sem áætlað er að geyma,

h) upplýsingar um rekstrarform að lögum, að því er varðar stuðning frá nýsköpunarsjóðnum sem talsmaður verkefnisins óskar eftir.

5. Á grundvelli þess sem var sent skv. 4. mgr. þessarar greinar skal framkvæmdastjórnin, að höfðu samráði við aðildarríkin í samræmi við 2. mgr. 21. gr., samþykkja ákvörðun um veitingu stuðnings þar sem stuðningur til valinna verkefna er nánar tilgreindur og, eftir því sem við á, taka saman varaskrá.

6. Nota má sértækt valferli fyrir minni háttar verkefni.

13. gr.

Þróunaraðstoð til verkefnis

1. Framkvæmdastjórnin skal, að höfðu samráð við aðildarríkin í samræmi við c-lið 2. mgr. 21. gr., ákveða hámarksfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltæk fyrir þróunaraðstoð til verkefnis.

2. Framkvæmdastjórnin eða framkvæmdaraðilinn skal veita þróunaraðstoð til verkefnis, í samræmi við 2. mgr. 12. gr., í formi styrks.

3. Heimilt er að fjármagna eftirfarandi starfsemi með þróunaraðstoð til verkefnis:

a) úrbætur og þróun á skjalahaldi í tengslum við verkefnið eða á þáttum í skipulagi verkefnisins með það fyrir augum að tryggja að verkefnið sé nægilega langt á veg komið,

b) mat á hagkvæmni verkefnisins, þ.m.t. tæknilegar og efnahagslegar athuganir,

c) ráðgjöf um fjárhagsskipan verkefnisins og rekstrarform þess að lögum,

d) að byggja upp getu talsmanns verkefnisins.

4. Að því er varðar þróunaraðstoð til verkefnis skal viðkomandi kostnaður vera allur kostnaður sem tengist þróun verkefnis. Nýsköpunarsjóðnum er heimilt að fjármagna allt að 100% af viðkomandi kostnaði.

III. KAFLI

Sértæk ákvæði sem gilda um önnur form stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum en styrki

14. gr.

Veiting stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum í formi framlaga til blendingsstarfsemi samkvæmt stuðningsfjármögnunarleið Sambandsins

1. Ef framkvæmdastjórnin ákveður að greiða stuðninginn frá nýsköpunarsjóðnum sem framlög til blendingsstarfsemi samkvæmt stuðningsfjármögnunarleið Sambandsins skal stuðningnum frá nýsköpunarsjóðnum komið til framkvæmda í samræmi við reglurnar sem gilda um stuðningsfjármögnunarleið Sambandsins. Þó skal meta aðstoðarhæfi verkefna í samræmi við 8. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB.

2. Framkvæmdastjórnin skal, að höfðu samráði við aðildarríkin, samþykkja ákvörðun þar sem tilgreint er nánar hvort framlag til blendingsstarfsemi sé í formi stuðnings sem ekki er greiddur til baka eða stuðnings sem er greiddur til baka eða hvort tveggja og tilgreind sú fjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltæk til greiðslu gegnum stuðnings-fjármögnunarleið Sambandsins.

15. gr.

Stuðningur frá nýsköpunarsjóðnum í öðru formi sem mælt er fyrir um í fjárhagsreglugerðinni

1. Ef framkvæmdastjórnin ákveður að greiða stuðninginn frá nýsköpunarsjóðnum í einhverju af því formi sem mælt er fyrir um í fjárhagsreglugerðinni, þó ekki sem styrk, skal framkvæmdastjórnin, að höfðu samráði við aðildarríkin, samþykkja ákvörðun þar sem tilgreind er fjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem er tiltæk til greiðslu í því formi sem og reglurnar sem gilda um umsókn um slíkan stuðning, val á verkefnum og greiðslu stuðningsins.

2. Verkefni sem fá stuðning frá nýsköpunarsjóðnum samkvæmt þessari grein skulu vera í samræmi við reglur Sambandsins um ríkisaðstoð.

IV. KAFLI

Stjórnun

16. gr.

Nýsköpunarsjóðnum komið til framkvæmda

1. Framkvæmdastjórnin skal koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda með beinni stjórnun, í samræmi við viðeigandi ákvæði 125. til 153. gr. fjárhagsreglugerðarinnar, eða með óbeinni stjórnun gegnum aðila sem um getur í c-lið 1. mgr. 62. gr. fjárhagsreglugerðarinnar.

2. Kostnaður sem stofnað er til í tengslum við aðgerðir til að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda, þ.m.t. stjórnunar- og rekstrarkostnaður, skal fjármagnaður af nýsköpunarsjóðnum.

17. gr.

Tilnefning framkvæmdaraðila

1. Ef framkvæmdastjórnin ákveður að fela framkvæmdaraðila tiltekin verkefni í tengslum við að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda skal framkvæmdastjórnin samþykkja ákvörðun um tilnefningu slíks framkvæmdaraðila.

Framkvæmdastjórnin og tilnefndi framkvæmdaraðilinn skulu gera samning þar sem mælt er fyrir um sérstaka skilmála og skilyrði sem framkvæmdaraðilinn skal fylgja þegar hann innir verkefni sín af hendi.

2. Ef framkvæmdastjórnin kemur nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda með beinni stjórnun og ákveður að fela framkvæmdaraðila tiltekin verkefni er varða framkvæmd skal hún tilnefna framkvæmdaskrifstofu sem framkvæmdaraðila.

3. Ef framkvæmdastjórnin kemur nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda með óbeinni stjórnun skal hún tilnefna aðila, sem um getur í c-lið 1. mgr. 62. gr. fjárhagsreglugerðarinnar, sem framkvæmdaraðila.

4. Að því marki sem verkefni sem varða það að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda eru ekki falin framkvæmdaraðila skal framkvæmdastjórnin inna þessi verkefni af hendi.

18. gr.

Verkefni framkvæmdaraðila

Heimilt er að fela framkvæmdaraðilanum, sem er tilnefndur í samræmi við 1. mgr. 17. gr., heildarstjórnun vegna auglýsingar eftir tillögum, greiðslu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum og vöktunar á framkvæmd valinna verkefna. Í því skyni er heimilt að fela framkvæmdaraðilanum eftirfarandi verkefni:

a) að skipuleggja auglýsingu eftir tillögum,

b) að skipuleggja málsmeðferð við umsókn, þ.m.t. að safna saman umsóknunum og greina öll fylgiskjöl,

c) að skipuleggja val á verkefni, þ.m.t. úttekt á verkefni eða áreiðanleikamat og forgangsröðun,

d) að ráðleggja framkvæmdastjórninni um verkefni sem veita á stuðning frá nýsköpunarsjóðnum og um verkefni sem skal setja í varaskrána,

e) að úthluta eða veita þróunaraðstoð til verkefnis,

f) að undirrita samninga um styrki og aðra samninga, með hliðsjón af formi stuðningsins frá nýsköpunarsjóðnum,

g) að undirbúa og halda utan um samningsskjöl er varða verkefni sem fá stuðning,

h) að kanna hvort skilyrði fyrir fjármögnun séu uppfyllt og greiða tekjur nýsköpunarsjóðsins til talsmanna verkefna,

i) að vakta framkvæmd verkefnis,

j) að hafa samskipti við talsmenn verkefna,

k) að gefa framkvæmdastjórninni skýrslu, þ.m.t. um almenna stefnu fyrir frekari þróun nýsköpunarsjóðsins,

l) reikningsskil,

m) aðgerðir er varða upplýsingar, samskipti og kynningar, þ.m.t. framleiðsla á kynningarefni, og þróun kennimerkis fyrir nýsköpunarsjóðinn,

n) stjórnun þekkingarmiðlunar,

o) að styðja aðildarríkin í viðleitni þeirra til að kynna nýsköpunarsjóðinn og hafa samskipti við talsmenn verkefna,

p) öll önnur verkefni sem varða að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda.

19. gr.

Sértæk ákvæði sem gilda um að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda með beinni stjórnun

1. Ef framkvæmdastjórnin tilnefnir framkvæmdaskrifstofu sem framkvæmdaraðila skv. 1. mgr. 17. gr. þessarar reglugerðar skal slík ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar vera með fyrirvara um niðurstöður úr kostnaðar- og ábatagreiningunni, sem um getur í 3. gr. reglugerðar ráðsins (EB) nr. 58/2003 ([6]), og samningurinn, sem um getur í annarri undirgrein 1. mgr. 17. gr. þessarar reglugerðar, skal vera í formi gernings um úthlutun verkefna í samræmi við reglugerð (EB) nr. 58/2003.

2. Ef fjárhæðir sem eru greiddar með beinni stjórnun eru endurheimtar skv. 7. og 8. gr. þessarar reglugerðar skulu endurheimtu fjárhæðirnar mynda markaðar tekjur í samræmi við 21. gr. fjárhagsreglugerðarinnar og skulu notaðar til að fjármagna starfsemi nýsköpunarsjóðsins.

3. Að því er varðar öll framkvæmdarverkefni sem framkvæmdastjórnin innir af hendi, þ.m.t. gegnum framkvæmdaskrifstofu, skulu tekjur nýsköpunarsjóðsins mynda markaðar ytri tekjur í skilningi 1. og 5. mgr. 21. gr. fjárhagsreglugerðarinnar. Þessar mörkuðu tekjur skulu einnig taka til alls stjórnsýslukostnaðar sem tengist því að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda. Framkvæmdastjórninni er heimilt að nota að hámarki 5% af fjárhagsramma nýsköpunarsjóðsins til að mæta stjórnunarkostnaði sínum.

4. Verkefni sem hefur fengið stuðning frá nýsköpunarsjóðnum má einnig fá framlag frá öðrum áætlunum Sambandsins, þ.m.t. úr sjóðum undir sameiginlegri stjórnun, að því tilskildu að framlögin taki ekki til sama kostnaðar. Uppsöfnuð fjármögnun skal ekki fara yfir heildarfjárhæð aðstoðarhæfs kostnaðar við verkefnið og reikna má stuðninginn frá mismunandi áætlunum Sambandsins út hlutfallslega.

20. gr.

Stjórnun tekna nýsköpunarsjóðsins

1. Framkvæmdastjórnin skal tryggja að losunarheimildir, sem eru ætlaðar nýsköpunarsjóðnum, séu boðnar upp í samræmi við meginreglur og fyrirkomulag sem mælt er fyrir um í 4 mgr. 10. gr. tilskipunar 2003/87/EB og skal stjórna tekjum nýsköpunarsjóðsins í samræmi við markmið tilskipunar 2003/87/EB.

2. Framkvæmdastjórnin skal tryggja að tekjurnar, sem um getur í 1. mgr., skili sér tímanlega til framkvæmdaraðilans til að fjármagna kostnað sem tengist framkvæmdaraðgerðum og til að greiða stuðning til verkefna sem hlotið hafa stuðning.

([6]) Reglugerð ráðsins (EB) nr. 58/2003 frá 19. desember 2002 um stofnsamþykkt framkvæmdaskrifstofa sem verða falin tiltekin verkefni í tengslum við stjórnun áætlana Bandalagsins (Stjtíð. EB L 11, 16.1.2003, bls. 1).

3. Framkvæmdastjórninni er heimilt að fela Fjárfestingarbanka Evrópu að koma losunarheimildum í verð og að stjórna tekjum nýsköpunarsjóðsins. Ef um er að ræða slíkt framsal skulu framkvæmdastjórnin og Fjárfestingarbanki Evrópu gera samning þar sem mælt er fyrir um sérstaka skilmála og skilyrði sem Fjárfestingarbanki Evrópu skal fylgja þegar hann innir verkefni sín af hendi í tengslum við stjórnun tekna nýsköpunarsjóðsins.

4. Með fyrirvara um ákvæði tilskipunar 2003/87/EB skal nota tekjur nýsköpunarsjóðsins, sem eru eftirstandandi eftir að aðstoðarhæfistímabili studdra verkefna er lokið, til að styðja ný verkefni sem uppfylla viðmiðanir um aðstoðarhæfi sem mælt er fyrir um í 8. mgr. 10. gr. a í tilskipun 2003/87/EB þar til allar tekjurnar hafa verið notaðar vegna markmiða nýsköpunarsjóðsins. Þess háttar ný verkefni skulu valin með nýjum auglýsingum eftir tillögum í samræmi við 9. gr. eða studd í samræmi við 14. eða 15. gr.

21. gr.

Hlutverk aðildarríkjanna

1. Þegar nýsköpunarsjóðnum er komið í framkvæmd skal framkvæmdastjórnin hafa samráð við aðildarríkin og njóta aðstoðar þeirra.

2. Hafa skal samráð við aðildarríkin um:

a) skrána yfir fyrirframvalin verkefni, þ.m.t. varaskráin, og skrána yfir verkefni sem lögð eru til vegna þróunaraðstoðar til verkefnis, í samræmi við 2. mgr. 12. gr., áður en stuðningur er veittur,

b) drög að ákvörðunum framkvæmdastjórnarinnar sem um getur í 9. gr. (1. mgr.), 14. gr. (2. mgr.) og 15. gr. (1. mgr.),

c) hámarksfjárhæð stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem skal gerð tiltæk fyrir þróunaraðstoð til verkefnis.

3. Aðildarríkin skulu, ef framkvæmdastjórnin óskar eftir því, veita framkvæmdastjórninni ráðgjöf og aðstoð að því er varðar:

a) að fastsetja almenna stefnu fyrir nýsköpunarsjóðinn,

b) að bregðast við fyrirliggjandi eða nýjum vandamálum í tengslum við framkvæmd verkefnis,

c) að bregðast við öllum öðrum viðfangsefnum í tengslum við framkvæmd verkefnis.

4. Framkvæmdastjórnin skal gefa aðildarríkjunum skýrslu um framvindu við að koma þessari reglugerð til framkvæmda, einkum að því er varðar framkvæmd ákvarðana um veitingu stuðnings sem um getur í 5. mgr. 12. gr.

22. gr.

Hlutverk hagsmunaaðila

Framkvæmdastjórninni er heimilt að bjóða hagsmunaaðilum að taka þátt í umræðum er varða að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda, þ.m.t. um viðfangsefnin sem eru tilgreind í 3. mgr. 21. gr.

V. KAFLI

Vöktun, skýrslugjöf og úttekt

23. gr.

Vöktun og skýrslugjöf

1. Framkvæmdaraðilinn skal vakta starfsemi nýsköpunarsjóðsins, þ.m.t. fjárhæðir stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum sem eru greiddar.

2. Með það í huga að tryggja að gögnum vegna vöktunar, sem um getur í 1. mgr., og niðurstöðum sé safnað á skilvirkan og árangursríkan hátt og tímanlega er heimilt að gera kröfur til talsmanna verkefna um hlutfallslega skýrslugjöf. Skýrslur talsmanna verkefna skulu innihalda upplýsingar um aðgerðir til miðlunar þekkingar sem ráðist er í skv. 27. gr.

3. Framkvæmdaraðilinn skal senda framkvæmdastjórninni skýrslu reglulega um framkvæmd verkefna sinna.

4. Framkvæmdaraðilinn skal gefa framkvæmdastjórninni skýrslu um allt ferlið við greiðslu stuðnings og einkum um skipulagningu auglýsinga eftir tillögum og um undirritun samninga við talsmenn verkefna.

5. Eftir að hverri auglýsingu eftir tillögum er lokið skal framkvæmdastjórnin gefa aðildarríkjunum skýrslu um framkvæmd viðkomandi auglýsingar eftir tillögum.

6. Framkvæmdastjórnin skal gefa ráðinu og Evrópuþinginu árlega skýrslu um framvinduna við að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda.

7. Framkvæmdaraðilar, aðrir en framkvæmdarskrifstofur, og einingar sem hefur verið falið að stjórna tekjum nýsköpunarsjóðsins skv. 3. mgr. 20. gr. skulu láta framkvæmdastjórninni eftirfarandi í té:

a) eigi síðar en 15. febrúar: óendurskoðuð reikningsskil sem taka til næstliðins fjárhagsárs, sem hefst 1. janúar og lýkur 31. desember, að því er varðar þá starfsemi sem þessum framkvæmdaraðilum og einingum hefur verið falin,

b) eigi síðar en 15. mars á því ári sem óendurskoðuð reikningsskil eru lögð fram: endurskoðuð reikningsskil sem taka til næstliðins fjárhagsárs, sem hefst 1. janúar og lýkur 31. desember, að því er varðar þá starfsemi sem þessum framkvæmdaraðilum og einingum hefur verið falin.

Framkvæmdastjórnin skal taka saman ársreikninga nýsköpunarsjóðsins fyrir hvert fjárhagsár, sem skal hefjast 1. janúar og ljúka 31. desember, á grundvelli reikningsskila sem lögð eru fram samkvæmt fyrstu undirgrein. Þessir reikningar skulu falla undir óháða, utanaðkomandi endurskoðun.

Öll reikningsskil og reikningar, sem kveðið er á um í þessari málsgrein, skulu tekin saman í samræmi við reikningsskilareglurnar sem um getur í 80. gr. fjárhagsreglugerðarinnar.

24. gr.

Úttekt

1. Á árinu 2025 og á fimm ára fresti eftir það skal framkvæmdastjórnin inna af hendi úttekt á starfsemi nýsköpunarsjóðsins. Í úttektinni skal áherslan lögð á, en ekki takmarkast við, mat á samlegðaráhrifum milli nýsköpunarsjóðsins og annarra viðkomandi áætlana Sambandsins sem og ferlinu við greiðslu stuðnings frá nýsköpunarsjóðnum.

2. Framkvæmdastjórnin skal, eftir því sem við á, á grundvelli niðurstaðna úr úttektinni sem um getur í 1. mgr. þessarar greinar, gera tillögur til að tryggja að nýsköpunarsjóðurinn þróist áfram í áttina að því að ná markmiðunum með honum sem kveðið er á um í tilskipun 2003/87/EB og í 3. gr. þessarar reglugerðar.

3. Þegar lokið hefur verið við að koma nýsköpunarsjóðnum til framkvæmda, en eigi síðar en 2035, skal framkvæmdastjórnin gera lokaúttekt á starfsemi nýsköpunarsjóðsins.

4. Framkvæmdastjórnin skal gera niðurstöður úttekta, sem ráðist er í skv. 1., 2. og 3. mgr., öllum aðgengilegar.

VI. KAFLI

Endurskoðanir, kynning og miðlun þekkingar

25. gr.

Endurskoðanir

1. Endurskoðanir er varða notkun á stuðningi frá nýsköpunarsjóðnum sem óháðir, utanaðkomandi endurskoðendur annast, þ.m.t. aðrir en þeir sem eru með umboð frá stofnunum eða aðilum Sambandsins, skulu lagðar til grundvallar allsherjarstaðfestingu (e. *overall assurance*) skv. 26. gr.

2. Sérhver einstaklingur eða eining sem hlýtur stuðning frá nýsköpunarsjóðnum skal samþykkja skriflega að veita nauðsynleg réttindi og aðgang eins og kveðið er á um í 129. gr. fjárhagsreglugerðarinnar.

26. gr.

Þverlægt traust á endurskoðunum

Með fyrirvara um fyrirliggjandi möguleika á að inna af hendi frekari endurskoðanir, ef óháður endurskoðandi hefur gert endurskoðun, sem byggist á alþjóðlega viðurkenndum endurskoðunarstöðlum sem veita fullnægjandi tryggingu, á reikningsskilum og skýrslum þar sem notkun á framlagi Sambandsins kemur fram skal endurskoðunin lögð til grundvallar allsherjarstaðfestingu, eins og nánar er tilgreint, eftir því sem við á, í geirabundnum reglum, að því tilskildu að nægar sannanir séu fyrir óhæði og hæfi endurskoðandans. Skýrsla óháða endurskoðandans og tengd endurskoðunarskjöl skulu gerð aðgengileg að beiðni Evrópuþingsins, framkvæmdastjórnarinnar, Endurskoðunarréttarins og endurskoðunaryfirvalda aðildarríkjanna.

27. gr.

Samskipti, miðlun þekkingar og kynning

1. Talsmenn verkefna skulu, með virkum og kerfisbundnum hætti, gera upplýsingar á vefsetrum sínum, sem varða verkefni sem fá stuðning samkvæmt þessari reglugerð, aðgengilegar öllum. Slíkar upplýsingar skulu innihalda skýra tilvísun í fenginn stuðning frá nýsköpunarsjóðnum.

2. Talsmenn verkefna skulu tryggja samfellda, skilvirka og markvissa veitingu upplýsinga til ýmissa hópa um þann stuðning sem veittur hefur verið frá nýsköpunarsjóðnum, þ.m.t. fjölmiðlar og almenningur.

3. Nota skal kennimerki nýsköpunarsjóðsins eða annað kynningarefni, sem krafist er í samningsgögnum, fyrir alla starfsemi er varðar samskipti og miðlun þekkingar og skal það vera sýnilegt á tilkynningatöflum á mikilvægum stöðum sem eru aðgengilegir almenningi.

4. Talsmenn verkefna skulu veita nákvæmar upplýsingar um fyrirhugaðar aðgerðir, í samræmi við 1. og 2. mgr. þessarar greinar, í áætluninni um miðlun þekkingar sem er lögð fram í samræmi við 3. mgr. 10. gr.

5. Framkvæmdaraðilinn skal gera ráðstafanir til upplýsingar, samskipta og kynninga í tengslum við stuðning frá nýsköpunarsjóðnum og niðurstöður. Framkvæmdaraðilinn skal skipuleggja sérstakar málstofur, vinnufundi eða, eftir því sem við á, aðrar tegundir starfsemi til að auðvelda miðlun reynslu, þekkingar og bestu starfsvenja að því er varðar hönnun, undirbúning og framkvæmd verkefna sem og varðandi skilvirkni fjármögnunar sem er veitt með þróunaraðstoð vegna verkefna.

VII. KAFLI

Lokaákvæði

28. 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 26. febrúar 2019.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

REGLUGERÐ EVRÓPUÞINGSINS OG RÁÐSINS (ESB) 2019/128 2020/EES/73/08

frá 16. janúar 2019

um að koma á fót Evrópumiðstöð fyrir þróun starfsmenntunar (Cedefop), og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 337/75 (*)

EVRÓPUÞINGIÐ OG RÁÐ EVRÓPUSAMBANDSINS HAFA,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins, einkum 4. mgr. 166. gr. og 4. mgr. 165. gr.,

með hliðsjón af tillögu framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins,

eftir að hafa lagt drög að lagagerð fyrir þjóðþingin,

með hliðsjón af áliti efnahags- og félagsmálanefndar Evrópusambandsins ([1]),

að höfðu samráði við svæðanefndina,

í samræmi við almenna lagasetningarmeðferð ([2]),

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar (Cedefop) var stofnuð með reglugerð ráðsins (EBE) nr. 337/75 ([3]) til þess að liðsinna framkvæmdastjórn ESB við að stuðla að og þróa starfsmenntun og starfsþjálfun á vettvangi Sambandsins.

2) Allt frá því að hún var stofnuð árið 1975 hefur Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar gegnt mikilvægu hlutverki í að styðja við mótun sameiginlegrar stefnu á sviði starfsmenntunar. Á sama tíma hefur hugtakið starfsmenntun og merking þess þróast vegna breytinga á vinnumörkuðum, tækniþróunar, einkum á stafræna sviðinu, og vaxandi hreyfanleika vinnuafls. Þessir þættir gera þá áskorun að laga hæfni, menntun og hæfi betur að síbreytilegri eftirspurn enn erfiðari. Starfsmenntastefnur hafa sömuleiðis þróast og búa yfir hinum ýmsum tækjum og framtaksverkefnum, sem m.a. tengjast færni, menntun og hæfi og staðfestingu lærdóms, sem óhjákvæmilega ná út fyrir hefðbundin mörk starfsmenntunar. Því ætti að skilgreina með skýrum hætti eðli starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar með hliðsjón af núverandi starfsemi hennar, sem nær út fyrir starfsmenntun og tekur m.a. til vinnu varðandi færni og menntun og hæfi og aðlaga ber þann íðorðaforða sem notaður er til að lýsa markmiðum og verkefnum miðstöðvarinnar þannig að hann endurspegli þessa þróun.

3) Í matsskýrslu um Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar frá árinu 2013 kom fram að breyta beri reglugerð (EBE) nr. 337/75 þannig að vinna miðstöðvarinnar varðandi færni verði tilgreind sem eitt af verkefnum hennar og að vinna hennar við skýrslugjöf um stefnur og sameiginleg evrópsk verkfæri og framtaksverkefni verði felld með skýrari hætti inn í hana.

4) Til að styðja við framkvæmd stefnu á sviði starfsmenntunar þarf að beina sjónum að tengingunni milli menntunar og þjálfunar og vinnumarkaðarins til að tryggja að þekking, færni og hæfni sem fólk aflar sér styðji við nám alla ævi, aðlögun og ráðningarhæfi á breytilegum vinnumörkuðum og varði þarfir borgaranna og samfélagsins.

5) Reglugerð (EBE) nr. 337/75 hefur nokkrum sinnum verið breytt. Þar sem um frekari breytingar verður að ræða ætti að fella hana úr gildi í þágu skýrleika og önnur að koma í hennar stað.

6) Reglur um Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar ætti að setja, að því marki sem unnt er og með tilliti til þríhliða eðlis hennar, í samræmi við meginreglur sameiginlegrar yfirlýsingar Evrópuþingsins, ráðs Evrópusambandsins og framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins um sjálfstæðar sérstofnanir frá 19. júlí 2012.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 30, 31.1.2019, bls. 90. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 145/2020 frá 25. september 2020 um breytingu á bókun 31 við EES-samninginn, um samvinnu á sérstökum sviðum utan marka fjórþætta frelsisins, (síður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB C 209, 30.6.2017, bls. 49.

([2]) Afstaða Evrópuþingsins frá 11. desember 2018 (hefur enn ekki verið birt í Stjórnartíðindunum) og ákvörðun ráðsins frá 20. desember 2018.

([3]) Reglugerð ráðsins (EBE) nr. 337/75 frá 10. febrúar 1975 um að koma á fót Evrópumiðstöð fyrir þróun starfsmenntunar (Stjtíð. EB L 39, 13.2.1975, bls. 1).

7) Þar eð þríhliða sérstofnanirnar þrjár, þ.e. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar, Evrópustofnunin um bætt lífskjör og starfsskilyrði (Eurofound) og Evrópska vinnuverndarstofnunin (EU-OSHA), taka allar á málefnum sem tengjast vinnumarkaði, vinnuumhverfi, starfsmenntun og færni, er þörf á náinni samhæfingu þeirra. Einnig þurfa þær að eiga náið samstarf við Starfsmenntunarstofnun Evrópu. Starf Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar ætti því að koma til fyllingar starfi Starfsmenntunarstofnunar Evrópu, Evrópustofnunarinnar um bætt lífskjör og starfsskilyrði og Evrópsku vinnuverndarstofnunarinnar á sviðum þar sem þær eiga áþekkra hagsmuna að gæta og jafnframt ber að velja verkfæri, sem virka vel, s.s. viljayfirlýsingar. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar ætti að leita leiða til að efla skilvirkni og samlegðaráhrif og forðast skörun starfsemi sinnar við starfsemi Starfsmenntunarstofnunar Evrópu, Evrópustofnunarinnar um bætt lífskjör og starfsskilyrði og Evrópsku vinnuverndarstofnunarinnar, sem og framkvæmdastjórnar ESB. Að auki ætti miðstöðin, þar sem við á, að leitast við að vinna á skilvirkan hátt með innri rannsóknargetu stofnana Evrópusambandsins og utanaðkomandi sérhæfðum aðilum.

8) Við mat á Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar ætti framkvæmdastjórn ESB að hafa samráð við helstu hagsmunaaðila, þ.m.t. þá sem sitja í stjórn hennar og þingmenn á Evrópuþinginu.

9) Þríhliða eðli Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, Evrópustofnunarinnar um bætt lífskjör og starfsskilyrði og Evrópsku vinnuverndarstofnunarinnar er afar gagnleg birtingarmynd heildstæðrar nálgunar, sem byggist á skoðanaskiptum milli aðila vinnumarkaðarins og yfirvalda Sambandsins og landsyfirvalda og er gífurlega mikilvæg til þess að finna sameiginlegar og sjálfbærar félagslegar og efnahagslegar lausnir.

10) Til þess að gera ákvarðanatökuferli Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar hagkvæmara og stuðla að aukinni skilvirkni og árangri ætti að taka upp tveggja þrepa eftirlits- og stjórnunarkerfi. Í því skyni ættu aðildarríkin, landsbundin samtök atvinnuveitenda og launþega og framkvæmdastjórn ESB að eiga fulltrúa í stjórn sem fer með nauðsynlegar valdheimildir, þ.m.t. vald til að samþykkja fjárhagsáætlun og samþykkja áætlunarskjalið. Í áætlunarskjalinu, sem inniheldur vinnuáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar til margra ára og árlega vinnuáætlun hennar, ætti stjórnin að setja niður markviss forgangsatriði fyrir starfsemi miðstöðvarinnar. Enn fremur ættu, í þeim reglum sem stjórnin samþykkir til að koma í veg fyrir og takast á við hagsmunaárekstra, að vera ráðstafanir til að greina mögulegar hættur á byrjunarstigi.

11) Til að tryggja eðlilega starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar ættu aðildarríkin, evrópsk samtök atvinnuveitenda og launþega og framkvæmdastjórn ESB að tryggja að þeir sem tilnefndir eru í stjórnina hafi viðeigandi þekkingu á sviði starfsmenntunar, færni og menntunar og hæfis til að geta tekið stefnumótandi ákvarðanir og haft eftirlit með starfsemi miðstöðvarinnar.

12) Framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar ætti að hafa það hlutverk að undirbúa fundi stjórnar með viðeigandi hætti og styðja við ákvarðanatöku- og eftirlitsferla hennar. Þegar framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar aðstoðar stjórnina ætti hún, ef brýna nauðsyn ber til, að geta tekið ákveðnar bráðabirgðaákvarðanir fyrir hönd stjórnarinnar. Stjórnin ætti að samþykkja starfsreglur framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar.

13) Framkvæmdastjóri ætti að bera ábyrgð á heildarstjórnun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar í samræmi við stefnumörkun stjórnar, þ.m.t. daglegum rekstri, fjármálastjórnun og mannauðsstjórnun. Framkvæmdastjórinn ætti að beita þeim valdheimildum sem honum hafa verið faldar. Hægt ætti að vera að fella slíkar heimildir tímabundið úr gildi við sérstakar aðstæður, s.s. þegar um er að ræða hagsmunaárekstur eða alvarlega vanrækslu á skyldum samkvæmt starfsmannareglum embættismanna Evrópusambandsins (starfsmannareglunum).

14) Jafnræðisreglan er grundvallarregla í lögum Sambandsins. Þar er sú krafa gerð að jafnrétti karla og kvenna sé tryggt á öllum sviðum, þ.m.t. í atvinnu, störfum og launum. Allir aðilar ættu að leitast við að ná jöfnu hlutfalli karla og kvenna í stjórn og framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar. Stjórnin ætti einnig að stefna að þessu markmiði að því er varðar formann hennar og varaformenn samanlagt, og sama ættu hópar, sem eru fulltrúar ríkisstjórna og samtaka vinnuveitenda og launþega í stjórninni, að gera við tilnefningu varamanna til að sitja fundi framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar.

15) Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar rekur tengiskrifstofu í Brussel. Halda ætti opnum þeim möguleika að starfrækja þá skrifstofu áfram.

16) Uppfæra ætti fjárhagsákvæði og ákvæði um áætlanagerð og skýrslugjöf í tengslum við Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar. Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1271/2013 ([4]) kveður á um að Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skuli framkvæma fyrirfram- og eftirámat á þeim áætlunum og starfsemi sem leiða til umtalsverða útgjalda. Miðstöðin ætti að taka tillit til slíks mats við gerð áætlana sinna til margra ára og gerð ársáætlana.

([4]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1271/2013 frá 30. september 2013 um fjárhagslega rammareglugerð fyrir þá aðila sem um getur í 208. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) nr. 966/2012 (Stjtíð. ESB L 328, 7.12.2013, bls. 42).

17) Til að tryggja Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar fullt sjálfræði og sjálfstæði og til að gera henni kleift að uppfylla markmið sín og sinna verkefnum sínum með tilhlýðilegum hætti í samræmi við þessa reglugerð ætti hún að hafa fullnægjandi og sjálfstæðan fjárhag með tekjum sem koma fyrst og fremst sem framlag af fjárlögum Sambandsins. Fjárlagagerð Sambandsins ætti að gilda um Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar að því er varðar fjárframlag Sambandsins og aðra styrki sem veittir eru af fjárlögum þess. Endurskoðunarrétturinn ætti að annast endurskoðun reikningsskila miðstöðvarinnar.

18) Þýðingamiðstöðin fyrir stofnanir Evrópusambandsins (hér á eftir nefnd þýðingamiðstöðin) ætti að annast nauðsynlegar þýðingar vegna starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar ætti að vinna náið með þýðingamiðstöðinni að því að ákvarða vísa varðandi gæði, tímanleika og trúnaðarkvöð, að greina skilmerkilega þarfir og forgangsatriði Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og skapa gagnsæjar og hlutlausar verklagsreglur fyrir þýðingarferlið.

19) Ákvæði varðandi starfsfólk Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar ættu að vera í samræmi við starfsmannareglurnar og ráðningarskilmála annarra starfsmanna Sambandsins (ráðningarskilmála annarra starfsmanna) sem mælt er fyrir um í reglugerð ráðsins (EBE, KBE, KSE) nr. 259/68 ([5]).

20) Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar ætti að gera nauðsynlegar ráðstafanir til að tryggja örugga meðhöndlun og vinnslu trúnaðarupplýsinga. Ef þess er þörf ætti hún að samþykkja öryggisreglur jafngildar þeim sem settar eru fram í ákvörðunum framkvæmdastjórnarinnar (ESB, KBE) 2015/443 ([6]) og (ESB, KBE) 2015/444 ([7]).

21) Nauðsynlegt er að mæla fyrir um umbreytingarákvæði varðandi fjárhagsáætlanir og varðandi stjórn og starfsfólk til að tryggja að starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar haldi áfram á meðan þess er beðið að reglugerð þessi komi til framkvæmda.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

I. KAFLI

MARKMIÐ OG VERKEFNI

1. gr.

Stofnsetning og markmið

1. Evrópumiðstöð fyrir þróun starfsmenntunar (Cedefop) er hér með komið á fót sem sérstofnun Sambandsins.

2. Markmið Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skal vera að styðja við að efla, þróa og framkvæma stefnur Sambandsins á sviði starfsmenntunar og einnig stefnur varðandi færni og varðandi menntun og hæfi, með samstarfi við framkvæmdastjórn ESB, aðildarríkin og aðila vinnumarkaðarins.

Í því skyni skal hún efla og miðla þekkingu, veita gögn og þjónustu vegna stefnumótunar, þ.m.t. niðurstöður byggðar á rannsóknum, og greiða fyrir miðlun þekkingar meðal aðila Sambandsins og landsbundinna aðila og þeirra á milli.

2. gr.

Verkefni

1. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal hafa eftirfarandi verkefni með höndum í tengslum við þá málaflokka sem um getur í 2. mgr. 1. gr. en virða þó jafnframt að fullu ábyrgð aðildarríkjanna:

a) að greina þróun í stefnum og kerfum á sviði starfsmenntunar, færni og menntunar og hæfis og sjá fyrir samanburðargreiningum á þeim milli landa,

b) að greina þróun á vinnumarkaði í tengslum við færni, menntun og hæfi og starfsmenntun,

c) að greina og stuðla að þróun í tengslum við útfærslu á og veitingu staðfestinga á menntun og hæfi, skipulagi þeirra í ramma og hlutverk þeirra á vinnumarkaðnum, og í tengslum við starfsmenntun, með það fyrir augum að efla gagnsæi þeirra og viðurkenningu,

([5]) Stjtíð. EB L 56, 4.3.1968, bls. 1.
([6]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB, KBE) 2015/443 frá 13. mars 2015 um öryggismál hjá framkvæmdastjórninni (Stjtíð. ESB L 72, 17.3.2015, bls. 41).
([7]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB, KBE) 2015/444 frá 13. mars 2015 um öryggisreglur til verndar trúnaðarflokkuðum upplýsingum ESB (Stjtíð. ESB L 72, 17.3.2015, bls. 53).

d) að greina og stuðla að þróun á sviði staðfestingar á óformlegu og formlausu námi,

e) að framkvæma eða láta framkvæma athuganir og að gera rannsóknir um viðeigandi félagslega og hagræna þróun og tengd stefnumál,

f) að sjá ríkisstjórnum, aðilum vinnumarkaðarins og öðrum hagsmunaaðilum á landsvísu fyrir vettvangi til að skiptast á reynslu og upplýsingum,

g) að stuðla að framkvæmd umbóta og stefna á landsvísu, þ.m.t. með gagnreyndum upplýsingum og greiningum,

h) að miðla upplýsingum í því skyni að leggja sitt af mörkum til stefna og til þess að vekja fólk til vitundar og skilnings um möguleika starfsmenntunar til þess að ýta undir og styðja ráðningarhæfi fólks, framleiðni og ævinám,

i) að stjórna tólum, gagnasöfnum og þjónustu varðandi starfsmenntun, færni, starfsgreinar og menntun og hæfi og gera þau aðgengileg borgurunum, fyrirtækjum, stefnumótendum, aðilum vinnumarkaðarins og öðrum hagsmunaaðilum,

j) að koma á stefnuáætlun um tengsl við þriðju lönd og alþjóðastofnanir í samræmi við 29. gr. í tengslum við málefni sem liggja innan valdssviðs Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

2. Þegar nýrra rannsókna er þörf og áður en teknar eru stefnumótandi ákvarðanir skulu stofnanir Sambandsins taka tillit til sérþekkingar Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og rannsókna sem hún kann að hafa framkvæmt á viðkomandi sviði eða sem hún getur látið framkvæma, í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) 2018/1046 ([8]).

3. Í starfsemi sinni skal Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar taka mið af þeim tengslum sem eru á milli starfsmenntunar og annarra sviða menntunar og þjálfunar.

4. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar getur gert samstarfssamninga við aðrar viðeigandi sérstofnanir Sambandsins til að auðvelda og efla samstarf við þær.

5. Við framkvæmd verkefna sinna skal Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar viðhafa náin skoðanaskipti, einkum við sérhæfða aðila sem vinna að stefnum á sviði starfsmenntunar, á sviði færni og á sviði menntunar og hæfis, hvort sem þeir eru opinberir eða einkaaðilar, landsbundnir eða alþjóðlegir, við opinber yfirvöld og menntastofnanir, við samtök vinnuveitenda og launþega og við landsbundna þríhliða aðila, þar sem þeir eru fyrir hendi. Með fyrirvara um markmið sín og tilgang skal Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar eiga samstarf við aðrar sérstofnanir Sambandsins, einkum Starfsmenntunarstofnun Evrópu, Evrópustofnunina um bætt lífskjör og starfsskilyrði og Evrópsku vinnuverndarstofnunina og stuðla að samlegðaráhrifum og fylld við starfsemi þeirra en forðast jafnframt hvers konar tvíverknað.

II. KAFLI

SKIPULAG EVRÓPUMIÐSTÖÐVARINNAR FYRIR ÞRÓUN STARFSMENNTUNAR

3. gr.

Skipulag stjórnsýslu og stjórnunarfyrirkomulag

Stjórnsýsluskipulag og stjórnunarfyrirkomulag Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skal samanstanda af:

a) stjórn,

b) framkvæmdastjórn,

c) framkvæmdastjóra.

1. HLUTI

Stjórn

4. gr.

Skipan stjórnar

1. Stjórnina skulu skipa eftirfarandi aðilar:

a) einn fulltrúi ríkisstjórnar hvers aðildarríkis,

b) einn fulltrúi samtaka vinnuveitenda hvers aðildarríkis,

([8]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) 2018/1046 frá 18. júlí 2018 um fjárhagsreglur sem gilda um fjárlög Sambandsins, breytingu á reglugerðum (ESB) nr. 1296/2013, (ESB) nr. 1301/2013, (ESB) nr. 1303/2013, (ESB) nr. 1304/2013, (ESB) nr. 1309/2013, (ESB) nr. 1316/2013, (ESB) nr. 223/2014, (ESB) nr. 283/2014, og ákvörðun nr. 541/2014/ESB og niðurfellingu reglugerðar (ESB, KBE) nr. 966/2012 (Stjtíð. ESB L 193, 30.7.2018, bls. 1).

c) einn fulltrúi samtaka launþega hvers aðildarríkis,

d) þrír fulltrúar framkvæmdastjórnar ESB,

e) einn óháður sérfræðingur, skipaður af Evrópuþinginu.

Hver og einn fulltrúanna, sem um getur í a- til d-lið, skal hafa atkvæðisrétt.

Ráðið skal skipa fulltrúana, sem um getur í a-, b- og c-lið, úr hópi þeirra sem tilnefndir hafa verið af aðildarríkjunum og af evrópskum samtökum vinnuveitanda og evrópskum samtökum launþega.

Framkvæmdastjórn ESB skal skipa fulltrúana sem um getur í d-lið.

Viðkomandi nefnd Evrópuþingsins skal skipa sérfræðinginn sem um getur í e-lið.

2. Hver stjórnarmaður skal hafa varamann. Varamaðurinn skal koma fram fyrir hönd stjórnarmannsins í fjarveru hans. Varamenn skulu skipaðir í samræmi við 1. mgr.

3. Stjórnarmenn og varamenn þeirra skulu tilnefndir og skipaðir á grundvelli þekkingar sinnar á sviði starfsmenntunar, færni og menntunar og hæfis, að teknu tilliti til viðeigandi færni þeirra, s.s. stjórnunarhæfileika og færni á sviði stjórnsýslu og fjárhagsáætlunargerðar og sérþekkingar á sviði kjarnaverkefna Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar til þess að þeir geti gegnt skilvirku eftirlitshlutverki. Allir aðilar sem eiga fulltrúa í stjórninni skulu leitast við að takmarka skipti á fulltrúum til að tryggja samfellu í starfi hennar. Allir aðilar skulu leitast við að ná jöfnu hlutfalli karla og kvenna í stjórninni.

4. Sérhver stjórnarmaður og varamaður skal undirrita skriflega yfirlýsingu þegar hann tekur sæti í stjórninni, þess efnis að hann sé ekki í aðstöðu sem veldur hagsmunaárekstri. Sérhver stjórnarmaður og varamaður skal uppfæra yfirlýsingu sína ef breyting verður á aðstæðum hans að því er varðar hvers kyns hagsmunaárekstra. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal birta yfirlýsingarnar og uppfærslur þeirra á vefsetri sínu.

5. Skipunartími stjórnarmanna og varamanna þeirra skal vera fjögur ár. Heimilt skal vera að endurnýja skipunartímann. Þegar skipunartíma þeirra lýkur eða segi þeir af sér skulu stjórnarmenn og varamenn halda áfram störfum þar til skipunartími þeirra hefur verið endurnýjaður eða aðrir hafa verið skipaðir í þeirra stað.

6. Fulltrúar ríkisstjórna, samtaka launþega og samtaka vinnuveitenda mynda hver sinn hóp í stjórninni. Hver hópur skal tilnefna samræmingaraðila til að umræður innan hópanna og á milli þeirra verði skilvirkari. Samræmingaraðilar hóps vinnuveitenda og hóps launþega skulu vera fulltrúar þeirra evrópsku samtaka sem þeir tilheyra og tilnefna má þá úr hópi skipaðra stjórnarmanna. Samræmingaraðilar sem ekki eru skipaðir stjórnarmenn í samræmi við 1. mgr. skulu sitja fundi stjórnar án atkvæðisréttar.

5. gr.

Hlutverk stjórnar

1. Stjórnin skal:

a) marka stefnuna fyrir starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar,

b) samþykkja ár hvert, með atkvæðum tveggja þriðju hluta atkvæðisbærra stjórnarmanna og í samræmi við 6. gr., áætlunarskjal Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar sem inniheldur vinnuáætlun hennar til margra ára og árlega vinnuáætlun hennar fyrir næstkomandi ár,

c) samþykkja, með atkvæðum tveggja þriðju hluta atkvæðisbærra stjórnarmanna, árlega fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og sinna öðrum störfum í tengslum við þá fjárhagsáætlun samkvæmt III. kafla,

d) samþykkja samsteypta ársskýrslu um starfsemina ásamt mati á starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, leggja hvort tveggja fyrir Evrópuþingið, ráðið, framkvæmdastjórn ESB og Endurskoðunarréttinn eigi síðar en 1. júlí ár hvert og birta samsteyptu ársskýrsluna um starfsemina,

e) samþykkja fjárhagsreglur sem eiga við Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar í samræmi við 16. gr.,

f) samþykkja áætlun um aðgerðir gegn svikum, sem er í réttu hlutfalli við hættu á svikum með tilliti til kostnaðar og ábata af ráðstöfununum sem hrundið verður í framkvæmd,

g) samþykkja reglur til að koma í veg fyrir og stýra hagsmunaárekstrum að því er varðar stjórnarmenn og óháða sérfræðinga, og einnig landssérfræðinga sem lánaðir eru til starfa (e. seconded national experts) og annað starfsfólk sem ekki er ráðið til starfa af Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar eins og um getur í 19. gr.,

h) samþykkja og uppfæra reglulega samskipta- og miðlunaráætlanir á grundvelli þarfagreiningar og láta það endurspeglast í áætlunarskjali Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar,

i) setja sér starfsreglur,

j) beita, í samræmi við 2. mgr., að því er varðar starfsfólk Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, heimildum sem starfsmannareglurnar fela skipunaryfirvaldinu og sem ráðningarskilmálar annarra starfsmanna fela yfirvaldinu sem hefur heimild til að gera ráðningarsamning („valdheimildir skipunaryfirvaldsins“),

k) samþykkja viðeigandi framkvæmdareglur sem gilda um framkvæmd starfsmannareglnanna og ráðningarskilmála annarra starfsmanna í samræmi við 110. gr. starfsmannareglnanna,

l) skipa framkvæmdastjóra og, eftir því sem við á, framlengja skipunartíma hans eða víkja honum úr embætti, í samræmi við 18. gr.,

m) tilnefna þann sem annast skal bókhaldsstjórn, sem heyra skal undir starfsmannareglurnar og ráðningarskilmálana, og skal hann vera algerlega óháður öðrum við framkvæmd skyldustarfa sinna,

n) samþykkja starfsreglur framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar,

o) fylgjast með því að niðurstöðum og tilmælum, sem leiðir af innri eða ytri endurskoðunarskýrslum og matsgerðum, sem og af rannsóknum Evrópuskrifstofunnar um aðgerðir gegn svikum (OLAF), sé fylgt eftir á fullnægjandi hátt,

p) heimila gerð samstarfssamninga við lögbær yfirvöld þriðju landa og við alþjóðastofnanir í samræmi við 29. gr.

2. Stjórnin skal samþykkja, í samræmi við 110. gr. í starfsmannareglunum, ákvörðun sem byggist á 1. mgr. 2. gr. starfsmannareglnanna og 6. gr. ráðningarskilmála annarra starfsmanna, um að framselja viðeigandi valdheimildir skipunaryfirvaldsins til framkvæmdastjórans, og þar sem kveðið er á um með hvaða skilyrðum má fella niður þetta framsal valds. Framkvæmdastjóranum skal vera heimilt að framselja áfram þessar valdheimildir.

Ef sérstakar aðstæður krefjast þess er stjórninni heimilt að fella tímabundið úr gildi framsal á valdheimildum skipunaryfirvaldsins til framkvæmdastjórans og þeirra sem framkvæmdastjórinn hefur falið umboðið. Í slíkum tilvikum skal stjórnin framselja þær um takmarkaðan tíma til eins af fulltrúum framkvæmdastjórnar ESB sem hún tilnefnir, eða til einhvers starfsmanns annars en framkvæmdarstjórans.

6. gr.

Gerð áætlana til margra ára og ársáætlana

1. Árlega skal framkvæmdastjórinn, í samræmi við e-lið 5. mgr. 11. gr. þessarar reglugerðar, semja drög að áætlunarskjali sem inniheldur vinnuáætlun til margra ára og árlega vinnuáætlun í samræmi við 32. gr. framseldrar reglugerðar (ESB) nr. 1271/2013.

2. Framkvæmdastjórinn skal leggja drögin að áætlunarskjalinu, sem um getur í 1. mgr., fyrir stjórnina. Þegar stjórnin hefur samþykkt drögin að áætlunarskjalinu skulu þau lögð fyrir framkvæmdastjórn ESB, Evrópuþingið og ráðið eigi síðar en 31. janúar ár hvert. Framkvæmdastjórinn skal leggja fram allar uppfærðar útgáfur skjalsins í samræmi við sömu aðferð. Stjórnin skal samþykkja áætlunarskjalið að teknu tilliti til álits framkvæmdastjórnar ESB.

Áætlunarskjalið skal verða endanlegt í framhaldi af lokasamþykkt fjárlaga Sambandsins og skal breyta því til samræmis við þau ef nauðsyn krefur.

3. Í vinnuáætluninni til margra ára skal setja fram heildarskipulagsáætlun, þ.m.t. markmið, væntar niðurstöður og frammistöðuvísa, og forðast skörun við áætlanir annarra sérstofnana. Í henni skal einnig setja fram áætlun um tilföng, þ.m.t. fjárhagsáætlun til margra ára og um starfsfólk. Hún skal innihalda stefnuáætlun um tengsl við þriðju lönd og alþjóðastofnanir í samræmi við 29. gr., aðgerðir sem tengjast stefnuáætluninni og tilgreina tilheyrandi tilföng.

4. Árlega vinnuáætlunin skal samræmast vinnuáætluninni til margra ára, sem um getur í 3. mgr., og skal innihalda:

a) nákvæm markmið og væntar niðurstöður, þ.m.t. frammistöðuvísa,

b) lýsingu á þeim aðgerðum sem á að fjármagna, þ.m.t. fyrirhugaðar ráðstafanir sem miða að því að auka skilvirkni,

c) upplýsingar um fjármagn og mannafla sem úthlutað er til hverrar starfsemi, í samræmi við meginreglur verkgrundaðrar fjárlagagerðar og stjórnunar,

d) hugsanlegar aðgerðir varðandi tengsl við þriðju lönd og alþjóðastofnanir í samræmi við 29. gr.

Þar skulu koma skýrt fram aðgerðir sem hefur verið bætt við, breytt eða eytt samanborið við næstliðið fjárhagsár.

5. Stjórnin skal breyta samþykktri árlegri vinnuáætlun ef Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar er úthlutað nýtt verkefni. Stjórninni er heimilt að framselja framkvæmdastjóranum vald til að gera óverulegar breytingar á árlegu vinnuáætluninni.

Hvers konar verulegar breytingar á árlegu vinnuáætluninni skulu samþykktar með sömu aðferð og upphaflega árlega vinnuáætlunin.

6. Áætlunin um tilföng skal uppfærð árlega. Skipulagsáætlunin skal uppfærð eftir því sem við á og þá einkum til að bregðast við niðurstöðunum úr matinu sem um getur í 27. gr.

Ef Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar er úthlutað nýrri starfsemi í því skyni að geta unnið verkefnin sem mælt er fyrir um í 2. gr. skal tekið tillit til þess við gerð fjárhagsáætlunar hennar og áætlunar um tilföng, með fyrirvara um valdheimildir Evrópuþingsins og ráðsins („fjárveitingarvaldsins“).

7. gr.

Stjórnarformaður

1. Stjórnin skal kjósa formann og þrjá varaformenn sem hér segir:

a) einn úr hópi fulltrúa ríkisstjórna aðildarríkjanna,

b) einn úr hópi fulltrúa samtaka vinnuveitenda,

c) einn úr hópi fulltrúa samtaka launþega,

d) einn úr hópi fulltrúa framkvæmdastjórnar ESB.

Formaðurinn og varaformennirnir skulu kosnir með meirihluta sem nemur tveimur þriðju hlutum atkvæða allra stjórnarmanna sem hafa atkvæðisrétt.

2. Skipunartími formannsins og varaformannanna skal vera eitt ár. Heimilt skal vera að endurnýja skipunartíma þeirra. Ef stjórnarsetu þeirra lýkur meðan á skipunartíma þeirra stendur skal skipunartíma þeirra ljúka sjálfkrafa á þeim degi.

8. gr.

Stjórnarfundir

1. Formaðurinn skal boða til funda stjórnarinnar.

2. Framkvæmdastjórinn skal taka þátt í umræðum, án atkvæðisréttar.

3. Stjórnin skal halda einn almennan fund á ári. Auk þess skal stjórnin koma saman að frumkvæði formanns, að beiðni framkvæmdastjórnar ESB eða að beiðni a.m.k. þriðja hluta stjórnarmanna.

4. Stjórnin má bjóða hverjum þeim sem kann að hafa eitthvað til málanna að leggja að sitja fundi sína sem áheyrnarfulltrúar. Fulltrúum landa innan Fríverslunarsamtaka Evrópu (EFTA) sem eru aðilar að samningnum um Evrópska efnahagssvæðið (EES-samningnum) er heimilt að sitja fundi stjórnarinnar sem áheyrnarfulltrúar þegar EES-samningurinn gerir ráð fyrir þátttöku þeirra í starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar í EES-samningnum.

5. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal annast skrifstofuhald stjórnar.

9. gr.

Reglur um atkvæðagreiðslu stjórnarinnar

1. Stjórnin skal taka ákvarðanir með meirihluta atkvæða stjórnarmanna sem hafa atkvæðisrétt, sbr. þó 5. gr. (b- og c-lið 1. mgr.), 7. gr. (aðra undirgrein 1. mgr.) og 18. gr. (7. mgr.).

2. Hver atkvæðisbær stjórnarmaður skal fara með eitt atkvæði. Í fjarveru atkvæðisbærs stjórnarmanns skal varamaður hans fara með atkvæðisrétt hans.

3. Formaðurinn skal taka þátt í atkvæðagreiðslum.

4. Framkvæmdastjórinn skal taka þátt í umræðum, án atkvæðisréttar.

5. Í starfsreglum stjórnarinnar skal kveða nánar á um fyrirkomulag atkvæðagreiðslu, einkum við hvaða aðstæður stjórnarmaður megi koma fram fyrir hönd annars stjórnarmanns.

2. ÞÁTTUR

Framkvæmdastjórn

10. gr.

Framkvæmdastjórn

1. Stjórnin skal njóta aðstoðar framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar.

2. Framkvæmdastjórnin skal:

a) undirbúa ákvarðanir sem stjórnin mun samþykkja,

b) fylgjast, ásamt stjórninni, með því að niðurstöðum og tilmælum, sem leiðir af innri eða ytri endurskoðunarskýrslum og matsgerðum, og af rannsóknum Evrópuskrifstofunnar um aðgerðir gegn svikum (OLAF), sé fylgt eftir á fullnægjandi hátt,

c) án þess að það hafi áhrif á ábyrgð framkvæmdastjórans eins og hún er sett fram í 11. gr., veita honum ráðgjöf, ef nauðsyn krefur, við framkvæmd ákvarðana stjórnarinnar, í því skyni að efla eftirlit með stjórnsýslu og fjárhagslegri stjórnun.

3. Ef nauðsyn krefur af brýnum ástæðum er framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar heimilt að taka ákveðnar bráðabirgðaákvarðanir fyrir hönd stjórnar, þ.m.t. um að fella tímabundið úr gildi framsal á valdheimildum skipunaryfirvaldsins í samræmi við skilyrðin sem um getur í 2. mgr. 5. gr. og um mál er varða fjárhagsáætlun.

4. Í framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar skulu eiga sæti formaður stjórnar, varaformennirnir þrír, samræmingaraðilar þeirra þriggja hópa sem um getur í 6. mgr. 4. gr. og einn fulltrúi framkvæmdastjórnar ESB. Hver þeirra hópa sem um getur í 6. mgr. 4. gr. getur tilnefnt allt að tvo varafulltrúa til að sitja fundi framkvæmdastjórnarinnar í fjarveru þess fulltrúa sem viðkomandi hópur hefur tilnefnt. Stjórnarformaður skal einnig vera formaður framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar. Framkvæmdastjórinn skal taka þátt í fundum framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar án atkvæðisréttar.

5. Skipunartími þeirra sem sæti eiga í framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar skal vera tvö ár. Heimilt skal vera að endurnýja skipunartímann. Skipunartíma þeirra sem sæti eiga í framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar skal ljúka á þeim degi þegar stjórnarsetu þeirra lýkur.

6. Framkvæmdastjórn miðstöðvarinnar skal koma saman þrisvar sinnum á ári. Að auki skal hún koma saman að frumkvæði formanns eða að beiðni stjórnarmanna. Eftir hvern fund skulu samræmingaraðilar hópanna þriggja sem um getur í 6. mgr. 4. gr. kappkosta að upplýsa hina í hópi sínum um efni umræðnanna, tímanlega og með gagnsæjum hætti.

3. HLUTI

Framkvæmdastjóri

11. gr.

Ábyrgð framkvæmdastjóra

1. Framkvæmdastjórinn skal bera ábyrgð á stjórnun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar í samræmi við stefnumörkun stjórnar og skal hann bera ábyrgð gagnvart stjórninni.

2. Framkvæmdastjórinn skal, með fyrirvara um valdsvið framkvæmdastjórnar ESB, stjórnarinnar og framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar, vera öðrum óháður við framkvæmd skyldustarfa sinna og hvorki leita eftir né taka við fyrirmælum frá neinni ríkisstjórn eða öðrum aðila.

3. Framkvæmdastjórinn skal gefa Evrópuþinginu skýrslu um framkvæmd skyldustarfa sinna sé honum boðið að gera það. Ráðið getur boðið framkvæmdastjóra að skýra frá störfum sínum.

4. Framkvæmdastjórinn skal vera lagalegur fyrirsvarsmaður Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

5. Framkvæmdastjórinn skal bera ábyrgð á framkvæmd verkefna sem Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar eru falin samkvæmt þessari reglugerð. Framkvæmdastjórinn skal einkum bera ábyrgð á:

a) daglegum rekstri Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, þ.m.t. að beita þeim valdheimildum sem honum hafa verið veittar að því er varðar starfsmannamál, í samræmi við 2. mgr. 5. gr.,

b) að framkvæma ákvarðanir sem stjórnin samþykkir,

c) ákvarðanatöku að því er varðar mannauðsstjórnun, í samræmi við ákvörðunina sem um getur í 2. mgr. 5. gr.,

d) að teknu tilliti til þarfa sem varða starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og til traustrar fjárhagslegrar stjórnunar, að taka ákvarðanir um innra skipulag miðstöðvarinnar, þ.m.t., ef nauðsyn krefur, um að fela staðgenglum verkefni sem kunna að taka til daglegrar stjórnunar hennar,

e) að taka saman áætlunarskjalið og leggja það fyrir stjórnina að höfðu samráði við framkvæmdastjórn ESB,

f) framkvæmd áætlunarskjalsins og skýrslugjöf til stjórnar um framkvæmd þess,

g) að taka saman samsteyptu ársskýrsluna um starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og að leggja hana fyrir stjórnina til mats og samþykkis,

h) að koma á fót skilvirku eftirlitskerfi til að hægt sé að framkvæma reglulegt mat, sem um getur í 27. gr., og tilkynningakerfi til að draga saman niðurstöður þess,

i) að semja drög að fjárhagsreglum fyrir Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar,

j) að taka saman drög að áætlun um tekjur og gjöld Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, sem hluta af áætlunarskjali hennar, og að framkvæma fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar,

k) að semja aðgerðaáætlun til að fylgja eftir niðurstöðum innri eða ytri endurskoðunarskýrslna og matsgerða, auk rannsókna Evrópuskrifstofunnar um aðgerðir gegn svikum og að gefa framvinduskýrslu tvisvar á ári til framkvæmdastjórnar ESB og reglulega til stjórnar og framkvæmdastjórnar miðstöðvarinnar,

l) að leitast við að tryggja jafnt hlutfall kynjanna innan Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar,

m) að vernda fjárhagslega hagsmuni Sambandsins með því að beita aðgerðum til að fyrirbyggja svik, spillingu og hvers konar annað ólöglegt athæfi, með skilvirku eftirliti og ef í ljós koma misfellur, með því að endurheimta fjárhæðir sem hafa verið ranglega greiddar og, eftir því sem við á, með fjárhagslegum og stjórnsýslulegum viðurlögum sem eru skilvirk, í réttu hlutfalli við brot og hafa varnaðaráhrif,

n) að semja áætlun um aðgerðir gegn svikum fyrir Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar og leggja hana fyrir stjórnina til samþykkis,

o) þar sem við á, samstarfi við aðrar sérstofnanir Sambandsins og því að gera samstarfssamninga við þær.

6. Framkvæmdastjórinn skal einnig bera ábyrgð á að ákveða hvort það sé nauðsynlegt fyrir skilvirka og áhrifaríka framkvæmd verkefna Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar að koma á fót tengiskrifstofu í Brussel til að efla samstarf miðstöðvarinnar við viðeigandi stofnanir Sambandsins. Sú ákvörðun útheimtir fyrirframsamþykki framkvæmda-stjórnar ESB, stjórnarinnar og hlutaðeigandi aðildarríkis. Í ákvörðuninni skal tilgreina umfang þeirrar starfsemi sem mun fara fram á tengiskrifstofunni þannig að forðast megi óþarfa kostnað og tvíverknað í stjórnsýslu Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

III. KAFLI

FJÁRHAGSÁKVÆÐI

12. gr.

Fjárhagsáætlun

1. Gera skal áætlun um allar tekjur og öll gjöld Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar fyrir hvert fjárhagsár og gera grein fyrir henni í fjárhagsáætlun miðstöðvarinnar. Fjárhagsárið skal samsvara almanaksárinu.

2. Jafnvægi skal vera milli tekna og útgjalda í fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

3. Tekjur Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skulu, með fyrirvara um önnur tilföng, samanstanda af:

a) framlagi frá Sambandinu sem fært er í fjárlög Sambandsins,

b) frjálsum fjárframlögum frá aðildarríkjunum,

c) innheimtum gjöldum fyrir útgefið efni og aðra þjónustu sem Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar veitir,

d) framlögum frá þriðju löndum sem taka þátt í starfi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, eins og kveðið er á um í 29. gr.

4. Til útgjalda Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skal telja launagreiðslur starfsmanna, stjórnsýslu- og skipulagskostnað og rekstrarútgjöld.

13. gr.

Gerð fjárhagsáætlunar

1. Ár hvert skal framkvæmdastjórinn setja saman drög að bráðabirgðaáætlun um tekjur og gjöld Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar fyrir komandi fjárhagsár, þ.m.t. yfirliti um stöðugildi, og senda til stjórnarinnar.

Þessi drög að bráðabirgðaáætlun skulu byggð á markmiðum og væntum niðurstöðum árlega áætlunarskjalsins, sem um getur í 1. mgr. 6. gr., og taka tillit til þess fjármagns sem þarf til að ná þessum markmiðum og væntum niðurstöðum, í samræmi við meginregluna um árangurstengda fjárlagagerð.

2. Stjórnin skal, á grundvelli draganna að bráðabirgðaáætlun, samþykkja drög að áætlun um tekjur og gjöld Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar fyrir komandi fjárhagsár og senda þau til framkvæmdastjórnar ESB eigi síðar en 31. janúar ár hvert.

3. Framkvæmdastjórn ESB skal senda fjárveitingavaldinu drögin að áætluninni ásamt drögum að fjárlögum Sambandsins. Drögin að áætluninni skulu einnig gerð aðgengileg Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar.

4. Á grundvelli draganna að áætluninni skal framkvæmdastjórn ESB fella inn í drögin að fjárlögum Sambandsins þá þætti fjárhagsáætlunarinnar, sem hún telur nauðsynlega með hliðsjón af yfirlitinu um stöðugildi og það framlag sem veita skal af fjárlögum og leggja þau fyrir fjárveitingavaldið í samræmi við 313. og 314. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins.

5. Fjárveitingavaldið skal heimila fjárveitingar vegna framlags af fjárlögum Sambandsins til Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

6. Fjárveitingavaldið skal samþykkja yfirlitið um stöðugildi fyrir Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar.

7. Stjórnin skal samþykkja fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar. Hún skal verða endanleg í framhaldi af lokasamþykkt fjárlaga Sambandsins og skal breyta henni til samræmis við þau ef nauðsyn krefur. Við breytingar á fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, þ.m.t. yfirlitinu um stöðugildi, skal fylgja sömu aðferð.

8. Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1271/2013 gildir um öll byggingarverkefni sem líklegt er að leiði til mikils kostnaðar á fjárhagsáætlun Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

14. gr.

Framkvæmd fjárhagsáætlunar

1. Framkvæmdastjórinn skal sjá um framkvæmd fjárhagsáætlunar Evrópumiðstöðvar fyrir þróun starfsmenntunar.

2. Ár hvert skal framkvæmdastjórinn senda fjárveitingavaldinu allar upplýsingar sem varða matsniðurstöður.

15. gr.

Framlagning og staðfesting reikninga

1. Sá sem annast bókhaldsstjórn hjá Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar skal senda þeim sem annast bókhaldsstjórn hjá framkvæmdastjórn ESB og Endurskoðunarréttinum bráðabirgðareikningsskil fyrir fjárhagsárið (ár N) eigi síðar en 1. mars næsta fjárhagsárs (ár N + 1).

2. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal senda skýrslu um stjórn fjárhagsáætlunar og fjármála á árinu N til Evrópuþingsins, ráðsins, framkvæmdastjórnar ESB og Endurskoðunarréttarins eigi síðar en 31. mars ársins N + 1.

3. Sá sem annast bókhaldsstjórn hjá framkvæmdastjórn ESB skal senda Endurskoðunarréttinum bráðabirgðareikningsskil Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar fyrir árið N, sem hafa verið felld inn í reikninga framkvæmdastjórnarinnar, eigi síðar en 31. mars ársins N + 1.

4. Þegar þeim sem annast bókhaldsstjórn fyrir Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar berast athugasemdir Endurskoðunarréttarins við bráðabirgðareikningsskil miðstöðvarinnar fyrir árið N, skv. 246. gr. reglugerðar (ESB, KBE) 2018/1046, skal hann ganga frá endanlegum reikningsskilum hennar fyrir það ár. Framkvæmdastjórinn skal leggja þau fyrir stjórnina til umsagnar.

5. Stjórnin skal skila áliti um endanleg reikningsskil Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar fyrir árið N.

6. Sá sem annast bókhaldsstjórn hjá Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar skal, eigi síðar en 1. júlí ársins N + 1, senda endanleg reikningsskil fyrir árið N til Evrópuþingsins, ráðsins, framkvæmdastjórnar ESB og Endurskoðunarréttarins ásamt áliti stjórnarinnar.

7. Endanleg reikningsskil fyrir árið N skulu birt í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins* eigi síðar en 15. nóvember ársins N + 1.

8. Framkvæmdastjórinn skal senda Endurskoðunarréttinum, eigi síðar en 30. september ársins N + 1, svar við athugasemdum réttarins sem settar voru fram í ársskýrslunni. Framkvæmdastjórinn skal einnig senda stjórninni svarið.

9. Fari Evrópuþingið þess á leit skal framkvæmdastjórinn láta því í té allar upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að greiðlega gangi að beita verklagsreglum við staðfestingu reikninga ársins N, í samræmi við 3. mgr. 109. gr. framseldrar reglugerðar (ESB) nr. 1271/2013.

10. Að fengnum tilmælum frá ráðinu sem tekur ákvörðun með auknum meirihluta, skal Evrópuþingið, fyrir 15. maí ársins N + 2, leysa framkvæmdastjórann undan ábyrgð á framkvæmd fjárhagsáætlunarinnar fyrir árið N.

16. gr.

Fjárhagsreglur

Stjórnin skal samþykkja fjárhagsreglur fyrir Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar að höfðu samráði við framkvæmdastjórn ESB. Þær mega ekki víkja frá framseldri reglugerð (ESB) nr. 1271/2013 nema sérstök þörf sé á slíku fráviki vegna reksturs Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og framkvæmdastjórn ESB hafi áður veitt samþykki sitt.

IV. KAFLI

STARFSFÓLK

17. gr.

Almenn ákvæði

1. Starfsmannareglurnar, ráðningarskilmálar annarra starfsmanna og reglurnar sem stofnanir Sambandsins hafa samþykkt sameiginlega til beitingar þessum starfsmannareglum og ráðningarskilmálum annarra starfsmanna gilda um starfsfólk Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

2. Stjórnin skal samþykkja viðeigandi framkvæmdarreglur sem gilda um framkvæmd starfsmannareglnanna og ráðningarskilmála annarra starfsmanna í samræmi við 110. gr. starfsmannareglnanna.

18. gr.

Framkvæmdastjóri

1. Framkvæmdastjórinn skal vera starfsmaður og skal hann ráðinn tímabundið til Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skv. a-lið 2. gr. ráðningarskilmála annarra starfsmanna.

2. Stjórnin skal skipa framkvæmdastjóra af skrá yfir umsækjendur sem framkvæmdastjórn ESB gerir tillögu um að loknu opnu og gagnsæju valferli.

Umsækjandanum, sem valinn er, skal boðið að gefa yfirlýsingu frammi fyrir Evrópuþinginu og svara spurningum þingmanna. Þau skoðanaskipti skulu ekki valda óþarfa töfum á skipuninni.

Formaður stjórnarinnar skal gera samning við framkvæmdastjórann fyrir hönd Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

3. Skipunartími framkvæmdastjóra skal vera fimm ár. Fyrir lok þess tímabils skal framkvæmdastjórn ESB framkvæma mat þar sem metin er frammistaða framkvæmdastjórans og framtíðarverkefni og -áskoranir Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

4. Stjórnin getur, með hliðsjón af matinu sem um getur í 3. mgr., framlengt skipunartíma framkvæmdastjóra í eitt skipti um allt að fimm ár.

5. Ef skipunartími framkvæmdastjóra hefur verið framlengdur skal hann ekki taka þátt í öðru valferli fyrir sömu stöðu við lok heildartímabilsins.

6. Einungis má víkja framkvæmdastjóranum úr starfi með ákvörðun stjórnar. Við þá ákvörðun sína skal stjórnin taka tillit til mats framkvæmdastjórnar ESB á frammistöðu framkvæmdastjórans eins og um getur í 3. mgr.

7. Stjórnin skal taka ákvarðanir um skipun framkvæmdastjóra, framlengingu skipunartíma hans eða brottvikningu hans úr starfi á grundvelli meirihluta sem nemur tveimur þriðju hlutum atkvæða atkvæðisbærra stjórnarmanna.

19. gr.

Landssérfræðingar sem lánaðir eru til starfa og annað starfsfólk

1. Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar er heimilt að njóta liðsinnis landssérfræðinga sem lánaðir eru til starfa eða annars starfsfólks sem ekki er ráðið til starfa af henni.

2. Stjórnin skal samþykkja ákvörðun þar sem mælt er fyrir um reglur um lán á landssérfræðingum til starfa hjá Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar.

V. KAFLI

ALMENN ÁKVÆÐI

20. gr.

Réttarstaða

1. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal vera sérstofnun Sambandsins. Hún skal hafa réttarstöðu lögaðila.

2. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal hafa það rétthæfi og gerhæfi í hverju aðildarríki sem löggjöf þess framast veitir lögaðilum. Henni er einkum og sér í lagi heimilt að afla sér lausafjár og fasteigna eða ráðstafa þeim og hún getur verið aðili að dómsmáli.

3. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal hafa aðsetur í Þessalóníku.

4. Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar er heimilt að koma á fót tengiskrifstofu í Brussel til að efla samstarf sitt við viðeigandi stofnanir Sambandsins, í samræmi við 6. mgr. 11. gr.

21. gr.

Sérréttindi og friðhelgi

Bókun 7 um sérréttindi og friðhelgi Evrópusambandsins gildir um Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar og starfsfólk hennar.

22. gr.

Tungumálanotkun

1. Ákvæði reglugerðar ráðsins nr. 1 ([9]) gilda um Evrópumiðstöðina fyrir þróun starfsmenntunar.

2. Þýðingamiðstöðin skal annast nauðsynlegar þýðingar vegna starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

([9]) Reglugerð ráðsins nr. 1, þar sem ákveðið er hvaða tungumál skulu notuð í Efnahagsbandalagi Evrópu (Stjtíð. EB 17, 6.10.1958, bls. 385).

23. gr.

Gagnsæi og persónuvernd

1. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal sjá til þess að starfsemi hennar fari fram með mjög gagnsæjum hætti.

2. Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1049/2001 ([10]) gildir um gögn í vörslu Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

3. Stjórnin skal, innan sex mánaða frá dagsetningu fyrsta fundar síns, samþykkja ítarlegar reglur varðandi beitingu reglugerðar (EB) nr. 1049/2001.

4. Vinnsla Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar á persónuupplýsingum skal falla undir reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2018/1725 ([11]). Stjórnin skal, innan sex mánaða frá dagsetningu fyrsta fundar síns, gera ráðstafanir vegna beitingar Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar á reglugerð (ESB) 2018/1725, þ.m.t. ráðstafanir varðandi skipun persónuverndarfulltrúa. Þessar ráðstafanir skulu gerðar að höfðu samráði við Evrópsku persónuverndarstofnunina.

24. gr.

Barátta gegn svikum

1. Til að auðvelda baráttuna gegn svikum, spillingu og annarri ólöglegri starfsemi, í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) nr. 883/2013 ([12]), skal Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar, eigi síðar en 21. ágúst 2019, gerast aðili að samstarfssamningnum milli stofnana frá 25. maí 1999 milli Evrópuþingsins, ráðs Evrópusambandsins og framkvæmdastjórnar Evrópubandalaganna um innri rannsóknir Evrópuskrifstofunnar um aðgerðir gegn svikum (OLAF) ([13]) og samþykkja viðeigandi ákvæði sem gilda um alla starfsmenn hennar, og nota til þess sniðmátið sem sett er fram í viðaukanum við þann samning.

2. Endurskoðunarrétturinn skal hafa heimild til að láta fara fram endurskoðun, á grundvelli skjala og vettvangsskoðana, hjá öllum styrkþegum, verktökum og undirverktökum sem hafa fengið fjárstyrk Sambandsins frá Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar.

3. Evrópuskrifstofan um aðgerðir gegn svikum getur hafið athuganir, þ.m.t. vettvangseftirlit og -athuganir, með það í huga að staðfesta hvort um svik, spillingu og annað ólöglegt athæfi hafi verið að ræða, sem hefur áhrif á fjárhagslega hagsmuni Sambandsins í tengslum við styrksamning, styrkákvörðun eða samning sem er fjármagnaður af Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar, í samræmi við ákvæði og málsmeðferðarreglur sem mælt er fyrir um í reglugerð (ESB, KBE) nr. 883/2013 og reglugerð ráðsins (KBE, EB) nr. 2185/96 ([14]).

4. Með fyrirvara um 1., 2. og 3. mgr. skulu samstarfssamningar við þriðju lönd og alþjóðastofnanir, samningar, styrksamningar og styrkákvarðanir Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar innihalda ákvæði sem veita Endurskoðunarréttinum og Evrópuskrifstofunni um aðgerðir gegn svikum heimild til að láta fara fram slíkar endurskoðanir og rannsóknir í samræmi við valdheimildir hvers þeirra um sig.

25. gr.

Öryggisreglur um verndun trúnaðarflokkaðra upplýsinga og viðkvæmra upplýsinga sem ekki eru trúnaðarflokkaðar

Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal samþykkja öryggisreglur sem jafnast á við öryggisreglur framkvæmdastjórnar ESB til verndar trúnaðarflokkuðum upplýsingum Evrópusambandsins (EUCI) og viðkvæmum upplýsingum sem ekki eru trúnaðarflokkaðar, sem settar eru fram í ákvörðunum (ESB, KBE) 2015/443 og (ESB, KBE) 2015/444 þar sem þess er krafist. Öryggisreglur Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skulu m.a. og eftir því sem við á, taka til ákvæða um skipti, vinnslu og geymslu slíkra upplýsinga.

([10]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1049/2001 frá 30. maí 2001 um almennan aðgang að skjölum Evrópuþingsins, ráðsins og framkvæmdastjórnarinnar (Stjtíð. EB L 145, 31.5.2001, bls. 43).

([11]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2018/1725 frá 23. október 2018 um vernd einstaklinga í tengslum við vinnslu stofnana, aðila, skrifstofa og sérstofnana Sambandsins á persónuupplýsingum og um frjálsa miðlun slíkra upplýsinga og um niðurfellingu reglugerðar (EB) nr. 45/2001 og ákvörðunar nr. 1247/2002/EB (Stjtíð. ESB L 295, 21.11.2018, bls. 39).

([12]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB, KBE) nr. 883/2013 frá 11. september 2013 um rannsóknir Evrópuskrifstofunnar um aðgerðir gegn svikum (OLAF) og um niðurfellingu á reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1073/1999 og reglugerð ráðsins (KBE) nr. 1074/1999 (Stjtíð. ESB L 248, 18.9.2013, bls. 1).

([13]) Stjtíð. EB L 136, 31.5.1999, bls. 15.

([14]) Reglugerð ráðsins (KBE, EB) nr. 2185/96 frá 11. nóvember 1996 um vettvangseftirlit og athuganir sem framkvæmdastjórnin framkvæmir til þess að vernda fjárhagslega hagsmuni Evrópubandalaganna gegn svikum og öðrum brotum (Stjtíð. EB L 292, 15.11.1996, bls. 2).

26. gr.

Bótaábyrgð

1. Um skaðabótaábyrgð Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar innan samninga fer að þeim lögum sem gilda um viðkomandi samning.

2. Dómstóll Evrópusambandsins (Dómstóllinn) skal hafa vald til að kveða upp dóma á grundvelli gerðardómsákvæða í samningi sem Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar hefur gert.

3. Þegar um er að ræða skaðabótaábyrgð utan samninga ber Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar, samkvæmt almennum meginreglum í lögum aðildarríkjanna, að bæta allt tjón sem deildir hennar eða starfsfólk kann að valda við skyldustörf sín.

4. Dómstóllinn fer með dómsvald í tengslum við bætur vegna tjóns sem um getur í 3. mgr.

5. Persónuleg bótaábyrgð starfsfólks gagnvart Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar skal lúta þeim ákvæðum sem mælt er fyrir um í starfsmannareglunum og í ráðningarskilmálum annarra starfsmanna.

27. gr.

Mat

1. Evrópumiðstöðin fyrir þróun starfsmenntunar skal, í samræmi við 5. mgr. 29. gr. framseldrar reglugerðar (ESB) nr. 1271/2013, framkvæma fyrirfram- og eftirámat á þeim áætlunum og starfsemi sem leiða til umtalsverðra útgjalda.

2. Eigi síðar en 21. febrúar 2024, og síðan á fimm ára fresti, skal framkvæmdastjórn ESB tryggja að framkvæmt sé mat í samræmi við viðmiðunarreglur framkvæmdastjórnarinnar á frammistöðu Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar í tengslum við markmið hennar, umboð og verkefni. Við mat sitt skal framkvæmdastjórnin hafa samráð við stjórnarmennina og aðra helstu hagsmunaaðila. Í matinu skal einkum fjallað um hvort þörf sé á að breyta umboði Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og fjárhagsleg áhrif slíkra breytinga.

3. Framkvæmdastjórn ESB skal gefa Evrópuþinginu, ráðinu og stjórninni skýrslu um niðurstöður matsins. Birta skal niðurstöður matsins opinberlega.

28. gr.

Stjórnsýsluathuganir

Aðgerðir Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar skulu heyra undir athuganir umboðsmanns Evrópusambandsins, í samræmi við 228. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins.

29. gr.

Samstarf við þriðju lönd og alþjóðastofnanir

1. Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar er heimilt að eiga samstarf við lögbær yfirvöld þriðju landa og alþjóðastofnanir að svo miklu leyti sem nauðsynlegt er til að ná þeim markmiðum sem sett eru fram í þessari reglugerð og með fyrirvara um valdsvið aðildarríkjanna og stofnana Sambandsins.

Í því skyni er Evrópumiðstöðinni fyrir þróun starfsmenntunar heimilt, með fyrirvara um leyfi stjórnar og að fengnu samþykki framkvæmdastjórnar ESB, að koma á samkomulagi um vinnutilhögun við lögbær yfirvöld þriðju landa og alþjóða-stofnanir. Þetta samkomulag skal ekki stofna til lagaskyldna sem hvíla á Sambandinu eða aðildarríkjum þess.

2. Þriðju löndum er frjálst að taka þátt í starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar ef þau hafa gert samninga þar að lútandi við Sambandið.

Samkvæmt viðeigandi ákvæðum samninganna sem um getur í fyrstu undirgrein skal ákveða nánara fyrirkomulag, þar sem sérstaklega er tilgreint hvernig, í hve miklum mæli og með hvaða hætti hlutaðeigandi þriðju lönd skuli taka þátt í starfi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, þ.m.t. ákvæði sem varða þátttöku í framtaksverkefnum sem miðstöðin framkvæmir, fjárframlög og starfsfólk. Þetta fyrirkomulag skal í öllum tilvikum vera í samræmi við starfsmannareglurnar að því er varðar starfsmannamál.

3. Stjórnin skal samþykkja stefnuáætlun um tengsl við þriðju lönd og alþjóðastofnanir varðandi málefni sem heyra undir valdheimildir Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar.

30. gr.

Samningur um höfuðstöðvar og rekstrarskilyrði

1. Í samningi um höfuðstöðvar milli Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar og aðildarríkisins, þar sem miðstöðin hefur aðsetur, skal mælt fyrir um nauðsynlegt fyrirkomulag varðandi húsnæði, sem miðstöðin fær í gistiaðildarríkinu og aðstöðu, sem viðkomandi aðildarríki sér henni fyrir, og auk þess sérstakar reglur sem skulu gilda í gistiaðildarríkinu fyrir framkvæmdastjórann, stjórnarmenn, starfsmenn miðstöðvarinnar og fjölskyldur þeirra.

2. Gistiaðildarríkið skal sjá til þess að nauðsynleg skilyrði séu fyrir hendi til að tryggja starfsemi Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar, þ.m.t. menntun á evrópskan mælikvarða sem fram fer á mörgum tungumálum og viðeigandi samgöngutengingar.

VI. KAFLI

UMBREYTINGARÁKVÆÐI

31. gr.

Umbreytingarákvæði varðandi stjórn

Fulltrúar yfirstjórnarinnar, sem komið var á fót á grundvelli 4. gr. reglugerðar (EBE) nr. 337/75, skulu halda áfram störfum og sinna þeim störfum stjórnar sem um getur í 5. gr. þessarar reglugerðar þar til stjórnarmenn og óháðir sérfræðingar hafa verið skipaðir samkvæmt 1. mgr. 4. gr. þessarar reglugerðar.

32. gr.

Umbreytingarákvæði varðandi starfsfólk

1. Framkvæmdastjóri Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar sem skipaður er á grundvelli 6. gr. reglugerðar (EBE) nr. 337/75 skal, það sem eftir lifir skipunartíma hans, gegna ábyrgð framkvæmdastjóra eins og mælt er fyrir um í 11. gr. þessarar reglugerðar. Aðrir skilmálar í samningi hans skulu haldast óbreyttir.

2. Ef val- og skipunarferli framkvæmdastjóra stendur yfir við gildistöku þessarar reglugerðar skulu ákvæði 6. gr. reglugerðar (EBE) nr. 337/75 gilda þar til því ferli er lokið.

3. Reglugerð þessi skal ekki hafa áhrif á réttindi og skyldur starfsfólks sem ráðið er samkvæmt reglugerð (EBE) nr. 337/75. Endurnýja má ráðningarsamninga þeirra samkvæmt þessari reglugerð í samræmi við starfsmannareglurnar og ráðningarskilmála annarra starfsmanna.

Áfram skal starfrækja sérhverja tengiskrifstofu Evrópumiðstöðvarinnar fyrir þróun starfsmenntunar sem er starfandi þegar reglugerð þessi tekur gildi.

33. gr.

Umbreytingarákvæði varðandi fjárhagsáætlanir

Staðfesting reikninga að því er varðar fjárhagsáætlanir, sem samþykktar eru á grundvelli 11. gr. reglugerðar (EBE) nr. 337/75, skal fara fram í samræmi við 12. gr. a í þeirri reglugerð.

VII. KAFLI

LOKAÁKVÆÐI

34. gr.

Niðurfelling

Reglugerð (EBE) nr. 337/75 er felld úr gildi og líta ber á allar tilvísanir í niðurfelldu reglugerðina sem tilvísanir í þessa reglugerð.

35. gr.

Áframhaldandi gildi innri reglna sem yfirstjórnin hefur samþykkt

Innri reglur sem yfirstjórnin hefur samþykkt á grundvelli reglugerðar (EBE) nr. 337/75 skulu gilda áfram eftir 20. febrúar 2019 nema stjórnin ákveði annað við beitingu þessarar reglugerðar.

36. 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 Strassborg 16. janúar 2019.

Fyrir hönd Evrópuþingsins,	*Fyrir hönd ráðsins,*
A. TAJANI	G. CIAMBA
forseti.	*forseti.*

REGLUGERÐ EVRÓPUÞINGSINS OG RÁÐSINS (ESB) nr. 596/2014 2020/EES/73/09

frá 16. apríl 2014

um markaðssvik (reglugerð um markaðssvik) og um niðurfellingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 2003/124/EB, 2003/125/EB og 2004/72/EB (*)

EVRÓPUÞINGIÐ OG RÁÐ EVRÓPUSAMBANDSINS HAFA,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins, einkum 114. gr.,

með hliðsjón af tillögu framkvæmdastjórnarinnar,

eftir að hafa lagt drög að lagagerð fyrir þjóðþingin,

með hliðsjón af áliti Seðlabanka Evrópu ([1]),

með hliðsjón af áliti efnahags- og félagsmálanefndar Evrópusambandsins ([2]),

í samræmi við almenna lagasetningarmeðferð ([3]),

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Einn heill og óskiptur markaður fyrir fjármálaþjónustu hefur mikla þýðingu fyrir hagvöxt og atvinnusköpun í Sambandinu.

2) Samþættur, skilvirkur og gagnsær fjármálamarkaður byggist á heilleika markaðarins. Snurðulaus starfsemi verðbréfamarkaða og tiltrú almennings á mörkuðunum er forsenda hagvaxtar og hagsældar. Markaðssvik skaða heilleika fjármálamarkaða og tiltrú almennings á verðbréfum og afleiðum.

3) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB ([4]) fullgerði og uppfærði lagaramma Sambandsins sem á að vernda heilleika markaðarins. Í ljósi þess að þróun löggjafar, markaðar og tækni frá gildistöku þeirrar tilskipunar hefur valdið verulegum breytingum á fjármálaumhverfinu ætti nú að skipta þeirri tilskipun út. Þörf er á nýjum lagagerningi til að tryggja samræmdar reglur og skýrleika lykilhugtaka og sameiginlegt regluverk í samræmi við niðurstöður skýrslu nefndar háttsettra embættismanna frá 25. febrúar 2009 um fjármálaeftirlit í Evrópusambandinu, undir formennsku Jacques de Larosière („de Larosière hópurinn“).

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 173, 12.6.2014, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 259/2019 frá 25. október 2019 um breytingu á IX. viðauka (Fjármálaþjónusta), við EES-samninginn (síður birtingar).

([1]) Stjtíð. ESB C 161, 7.6.2012, bls. 3.

([2]) Stjtíð. ESB C 181, 21.6.2012, bls. 64.

([3]) Afstaða Evrópuþingsins frá 10. september 2013 (hefur enn ekki verið birt í Stjórnartíðindunum) og ákvörðun ráðsins frá 14. apríl 2014.

([4]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB frá 28. janúar 2003 um innherjasvik og markaðsmisnotkun (markaðssvik) (Stjtíð. ESB L 96, 12.4.2003, bls. 16).

4) Þörf er á að koma á samræmdari og öflugri ramma til að vernda heilleika markaðar, komast hjá mögulegri eftirlitshögnun, tryggja að menn sæti ábyrgð ef gerð er tilraun til hagræðingar og kveða á um aukna réttarvissu og einfaldari reglur fyrir markaðsaðila. Þessi reglugerð miðar að því að stuðla á afgerandi hátt að snurðulausri starfsemi innri markaðarins og ætti því að byggjast á 114. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins (SUSE) eins og hún er túlkuð í samræmdri dómaframkvæmd Evrópudómstólsins.

5) Til að ryðja úr vegi síðustu viðskiptahindrununum og komast hjá verulegri samkeppnisröskun, sem er til komin vegna mismunandi laga eftir löndum, og til að koma í veg fyrir frekari viðskiptahindranir og verulega samkeppnisröskun í framtíðinni er nauðsynlegt að samþykkja reglugerð sem kemur á samræmdari túlkun á regluverki Sambandsins um markaðssvik, sem skilgreinir með skýrari hætti reglur sem gilda skulu í öllum aðildarríkjum. Framsetning krafna vegna markaðssvika í formi reglugerðar mun tryggja að þessar kröfur taki gildi án frekari lögfestingar. Þetta ætti að tryggja samræmd skilyrði með því að koma í veg fyrir ólíkar landsbundnar kröfur vegna lögleiðingar tilskipunar. Með þessari reglugerð verður þess krafist að allir aðilar fylgi sömu reglum í öllu Sambandinu. Hún mun einnig einfalda reglur og minnka kostnað fyrirtækja við að fylgja reglum, einkum fyrirtækja sem starfa yfir landamæri, og mun stuðla að því að útrýma röskun á samkeppni.

6) Orðsending framkvæmdastjórnarinnar frá 25. júní 2008 um „lög um lítil fyrirtæki í Evrópu“ hvetur Sambandið og aðildarríki þess til að semja reglur til að draga úr stjórnsýslubyrði, aðlaga löggjöf að þörfum útgefenda á mörkuðum fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki og auðvelda þessum útgefendum aðgengi að fjármagni. Nokkur ákvæði tilskipunar 2003/6/EB leggja stjórnsýslubyrði á útgefendur, einkum þá sem hafa fengið fjármálagerninga sína tekna til viðskipta á vaxtarmörkuðum lítilla og meðalstórra fyrirtækja, og úr henni ætti að draga.

7) Markaðssvik er hugtak sem nær yfir ólögmæta hegðun á fjármálamörkuðum og, að því er varðar þessa reglugerð, ætti að líta svo á að það nái yfir innherjasvik, ólögmæta miðlun innherjaupplýsinga og markaðsmisnotkun. Slík hegðun kemur í veg fyrir fullt og eðlilegt gagnsæi á markaði en það er meginforsendan fyrir viðskiptum allra rekstraraðila á samþættum fjármálamörkuðum.

8) Gildissvið tilskipunar 2003/6/EB miðaðist einkum við fjármálagerninga sem teknir eru til viðskipta á skipulegum markaði í aðildarríki eða óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta á slíkum markaði. Á undanförnum árum hafa viðskipti með fjármálagerninga þó í auknum mæli farið fram á markaðstorgum fjármálagerninga (e. *multilateral trading facilities* (MTFs)). Einnig eru til fjármálagerningar sem viðskipti eru aðeins með á annars konar skipulegum markaðstorgum (e. *organised trading facilities* (OTF)) eða eingöngu utan skipulegs verðbréfamarkaðar (e. *over the counter* (OTC)). Gildissvið þessarar reglugerðar ætti því að ná yfir alla fjármálagerninga sem viðskipti eru með á skipulegum markaði, markaðstorgi fjármálagerninga eða skipulegu markaðstorgi og hvers konar annað framferði eða aðrar aðgerðir sem gætu haft áhrif á slíkan fjármálagerning án tillits til þess hvort framferðið eða aðgerðin á sér stað á viðskiptavettvangi. Á tilteknum tegundum markaðstorga fjármálagerninga sem, líkt og skipulegir markaðir, aðstoða fyrirtæki við að sækja eiginfjárfjármögnun, gildir bannið gegn markaðssvikum einnig ef óskað hefur verið eftir töku til viðskipta á slíkum markaði. Gildissvið þessarar reglugerðar ætti því að ná yfir fjármálagerninga sem óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga. Þetta ætti að auka fjárfestavernd, vernda heilleika markaða og tryggja að skýrt bann sé við markaðssvikum með slíka gerninga.

9) Í þágu gagnsæis ættu rekstraraðilar skipulegs markaðar, markaðstorgs fjármálagerninga eða skipulegs markaðstorgs að tilkynna lögbærum yfirvöldum, án tafar, um þá fjármálagerninga sem þeir hafa tekið til viðskipta, sem óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta eða sem viðskipti hafa verið með á viðskiptavettvangi þeirra. Aðra tilkynningu skal senda þegar hætt er að taka gerninginn til viðskipta Slík skylda ætti einnig að gilda um fjármálagerninga sem óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta á viðskiptavettvangi þeirra og fjármálagerninga sem hafa verið teknir til viðskipta fyrir gildistöku þessarar reglugerðar. Lögbær yfirvöld ættu að leggja tilkynningarnar fyrir Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina (ESMA) og hún ætti að birta lista yfir alla fjármálagerningana sem tilkynnt er um. Þessi reglugerð gildir um fjármálagerninga hvort sem þeir eru á listanum sem Evrópska verðbréfamarkaðs-eftirlitsstofnunin hefur birt eða ekki.

10) Mögulegt er að tilteknum fjármálagerningum sem ekki eru viðskipti með á viðskiptavettvangi sé beitt til markaðssvika. Þar á meðal eru fjármálagerningar sem hafa verð eða virði sem er háð eða hefur áhrif á fjármálagerninga sem viðskipti eru með á viðskiptavettvangi, eða fjármálagerningar sem viðskipti með hafa áhrif á verð eða virði annarra fjármálagerninga sem viðskipti eru með á viðskiptavettvangi. Dæmi um aðstæður þar sem mögulegt er að beita slíkum gerningum til markaðssvika eru innherjaupplýsingar um hlutabréf eða skuldabréf, sem hægt er að nota til að kaupa

afleiðu af því hlutabréfi eða skuldabréfi, eða þegar gildi vísitölu er háð viðkomandi hlutabréfi eða skuldabréfi. Ef fjármálagerningur er notaður sem viðmiðunarverð er mögulegt að nota OTC-afleiðu til að hagnast á verði sem hefur verið hagrætt, eða til að hagræða verði fjármálagernings sem viðskipti eru með á viðskiptavettvangi. Annað dæmi er fyrirhuguð útgáfa nýs áhættuflokks verðbréfa, sem falla annars ekki undir gildissvið þessarar reglugerðar, en þar sem viðskipti með þessi verðbréf gætu haft áhrif á verð eða virði þeirra verðbréfa sem þegar eru skráð og falla undir gildissvið þessarar reglugerðar. Þessi reglugerð nær einnig yfir aðstæður þar sem verð eða virði gernings sem viðskipti eru með á viðskiptavettvangi er háð OTC-gerningi. Sama meginregla ætti að gilda um stundarsamninga um hrávöru sem eru verðlagðir á grundvelli afleiðu og um kaup á stundarsamningum um hrávöru sem fjármálagerningar vísa til.

11) Viðskipti með verðbréf eða tengda gerninga til verðjöfnunar verðbréfa eða viðskipti með eigin hlutabréf í endurkaupaáætlunum geta verið réttlætanleg af efnahagslegum ástæðum og ættu því, við tilteknar aðstæður, að vera undanþegin banni við markaðssvikum að því tilskildu að nauðsynlegt gagnsæi sé í framkvæmd aðgerðanna og upplýsingar sem skipta máli í tengslum við verðjöfnunina eða endurkaupaáætlunina séu birtar.

12) Viðskipti með eigin hlutabréf í endurkaupaáætlunum og verðjöfnun fjármálagernings, sem myndu ekki njóta undanþágu samkvæmt þessari reglugerð, ætti ekki í sjálfu sér að teljast vera markaðssvik.

13) Aðildarríki, aðilar að seðlabankakerfi Evrópu, ráðuneyti og aðrar stofnanir og félög með sérstakan tilgang í einu eða fleiri aðildarríkjum, og Sambandið og tilteknir aðrir opinberir aðilar eða einstaklingar sem aðhafast fyrir þeirra hönd, ættu ekki að falla undir takmarkanir við framfylgd peninga- eða gengisstefnu eða stefnu um skuldir hins opinbera, að því marki sem aðgerðir eru gerðar með hagsmuni almennings í huga og eingöngu í þeim tilgangi að framfylgja þessum stefnum. Enn fremur ætti ekki að takmarka viðskipti, fyrirmæli eða hegðun Sambandsins, félags með sérstakan tilgang í einu eða fleiri aðildarríkjum, Fjárfestingarbanka Evrópu, Evrópska fjármálastöðugleikasjóðsins, Evrópska stöðugleikakerfisins eða alþjóðlegrar fjármálastofnunar sem tvö eða fleiri aðildarríki hafa komið á fót, þegar þau vinna að fjármögnun og veita fjárhagsaðstoð til handa aðilum sínum. Slíka undanþágu frá gildissviði þessarar reglugerðar má, í samræmi við þessa reglugerð, rýmka þannig að hún nái yfir tiltekna opinbera aðila sem bera ábyrgð á, eða hafa afskipti af stýringu á opinberum skuldum og seðlabanka þriðju landa. Á sama tíma ættu undanþágur fyrir peninga- eða gengisstefnu eða stefnu um opinberar skuldir ekki að ná yfir tilvik þar sem þessir aðilar eiga í viðskiptum, gefa fyrirmæli eða stunda hegðun sem ekki miðast að því að framfylgja þessum stefnum eða ef aðilar sem starfa fyrir þessa aðila stunda viðskipti, gefa fyrirmæli eða viðhafa hegðun fyrir eigin reikning.

14) Upplýstir fjárfestar byggja fjárfestingarákvarðanir sínar á upplýsingum sem þeir hafa þá þegar aðgang að, þ.e.a.s. á aðgengilegum fyrirframupplýsingum. Þess vegna verður að meta á grundvelli hinna aðgengilegu fyrirframupplýsinga hve miklar líkur eru á því að upplýstur fjárfestir taki tillit til tiltekinna upplýsinga þegar hann tekur fjárfestingarákvörðun. Við slíkt mat verður að taka tillit til væntanlegra áhrifa upplýsinganna með hliðsjón af heildarstarfsemi viðkomandi útgefanda, áreiðanleika upplýsinganna og öllum öðrum markaðsbreytum sem eru líklegar til hafa áhrif á fjármálagerningana, tengda stundarsamninga um hrávörur eða uppboðsvörur sem grundvallast á losunarheimildum við hinar tilteknu aðstæður.

15) Eftiráupplýsingar má nota til að kanna hvort fyrirframupplýsingar hafa haft verðmótandi áhrif en ekki ætti að nota þær til að grípa til aðgerða gegn aðilum sem hafa dregið upplýstar ályktanir af fyrirframupplýsingum sem þeir höfðu aðgang að.

16) Ef innherjaupplýsingar varða ferli sem fer fram í þrepum gæti hvert þrep ferlisins, sem og heildarferlið, innihaldið innherjaupplýsingar. Milliþrep í langvarandi ferli getur í sjálfu sér falist í aðstæðum eða atburði sem er til staðar, eða raunhæfar líkur eru á að komi upp, á grundvelli heildarmats á þeim þáttum sem liggja fyrir á viðkomandi tíma. Þetta ætti þó ekki að túlka sem svo að taka verði tillit til umfangs áhrifa af þeim aðstæðum eða atburði á verð viðkomandi fjármálagerninga. Milliþrep ætti að teljast vera innherjaupplýsingar ef það, eitt og sér, uppfyllir viðmiðanirnar sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð um innherjaupplýsingar.

17) Upplýsingar um atburð eða aðstæður sem er milliþrep í langvarandi ferli geta t.d. varðað stöðu samningaviðræðna, skilmála sem eru samþykktir til bráðabirgða í samningaviðræðum, möguleikann á útboði fjármálagerninga, skilyrði fyrir markaðssetningu fjármálagerninga, bráðabirgðaskilmála útboðs fjármálagerninga eða að verið sé að íhuga að taka fjármálagerning með í mikilvæga vísitölu eða fella hann úr slíkri vísitölu.

18) Tryggja ber markaðsaðilum aukið réttaröryggi með því að skilgreina nánar tvo grundvallarþætti í skilgreiningu á innherjaupplýsingum, nánar tiltekið hvaða sérstaka vitneskja felst í viðkomandi upplýsingum og þýðingu mögulegra áhrifa þeirra á verð fjármálagerninganna, tengdra stundarsamninga um hrávörur eða uppboðsvara sem grundvallast á losunarheimildum. Að því er varðar afleiður sem eru heildsöluorkuafurðir ættu upplýsingar sem birta ber samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1227/2011 ([1]) sérstaklega að teljast innherjaupplýsingar.

19) Þessari reglugerð er ekki ætlað að banna umræður almenns eðlis um viðskipti og markaðsþróun milli hluthafa og stjórnenda sem varða útgefanda. Slík samskipti eru mikilvæg fyrir skilvirka starfsemi markaða og ætti ekki að banna þau með þessari reglugerð.

20) Stundarmarkaðir og tengdir afleiðumarkaðir eru mjög samtengdir og alþjóðlegir og markaðssvik geta átt sér stað þvert á markaði sem og yfir landamæri en það getur valdið verulegri kerfisáhættu. Þetta á bæði við um innherjasvik og markaðsmisnotkun. Einkum geta innherjaupplýsingar frá stundarmarkaði gagnast aðila sem á viðskipti á fjármálamarkaði. Innherjaupplýsingar í tengslum við hrávöruafleiðu ætti að skilgreina sem upplýsingar sem bæði uppfylla hina almennu skilgreiningu á innherjaupplýsingum í tengslum við fjármálamarkaði og sem ber að gera opinberar í samræmi við lagaákvæði og reglur Sambandsins eða einstakra landa, reglur á markaði, samninga eða venjur á viðkomandi markaði með hrávöruafleiður eða stundarmarkaði. Eftirtektarverð dæmi um slíkar reglur eru m.a. reglugerð (ESB) nr. 1227/2011 um orkumarkaðinn og sameiginlega framtaksverkefnið um olíugögn (e. *Joint Organisations Database Initiative* (JODI)). Slíkar upplýsingar geta verið grundvöllur ákvarðana markaðsaðila um að gera afleiðusamninga um hrávörur eða tengda stundarsamninga um hrávörur og ættu því að teljast vera innherjaupplýsingar sem ber að gera opinberar ef líklegt er að þær hafi veruleg áhrif á verð slíkra afleiða eða tengdra stundarsamninga um hrávörur.

Þar að auki getur misnotkun einnig teygt sig yfir stundar- og afleiðumarkaði. Viðskipti með fjármálagerninga, þ.m.t. hrávöruafleiður, má nota til að hagræða tengdum stundarsamningum um hrávörur og nota má stundarsamninga um hrávörur til að hagræða tengdum fjármálagerningum. Bannið við markaðsmisnotkun ætti því að fanga þessi innbyrðis tengsl. Það þykir þó hvorki rétt né framkvæmanlegt að rýmka gildissvið þessarar reglugerðar til að hún nái yfir hegðun sem varðar ekki fjármálagerninga, t.d. viðskipti með stundarsamninga um hrávörur sem aðeins hafa áhrif á stundarmarkaðinn. Að því er varðar heildsöluorkuafurðir sérstaklega ættu lögbær yfirvöld að taka tillit til sérstakra einkenna skilgreininganna í reglugerð (ESB) nr. 1227/2011 er þau beita skilgreiningum innherjaupplýsinga, innherjasvika og markaðsmisnotkunar, samkvæmt þessari reglugerð, á fjármálagerninga í tengslum við heildsöluorkuafurðir.

21) Samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB ([2]) bera framkvæmdastjórnin, aðildarríkin og aðrir opinberlega tilnefndir aðilar, m.a., ábyrgð á tæknilegri útgáfu losunarheimilda, gjaldfrjálsri úthlutun þeirra til hæfra atvinnugreina og nýrra aðila og almennt á þróun og framkvæmd á loftslagstefnuramma Sambandsins sem er grundvöllur fyrir framboð á losunarheimildum til aðila innan losunarviðskiptakerfis Sambandsins (viðskiptakerfi ESB fyrir losunarheimildir) sem skylt er að kaupa þær. Við framkvæmd þessara skyldna geta þessir opinberu aðilar, m.a., haft aðgang að verðnæmum, óopinberum upplýsingum og geta, samkvæmt tilskipun 2003/87/EB, þurft að framkvæma tilteknar markaðsaðgerðir í tengslum við losunarheimildir. Í kjölfar þess að losunarheimildir eru flokkaðar sem fjármálagerningar sem hluti af endurskoðun tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/39/EB ([3]) munu þeir gerningar einnig falla undir gildissvið þeirrar reglugerðar.

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1227/2011 frá 25. október 2011 um heildstæðan og gagnsæjan heildsölumarkað fyrir orku (Stjtíð. ESB L 326, 8.12.2011, bls. 1).

([2]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB frá 13. október 2003 um að koma á fót kerfi fyrir viðskipti með heimildir til losunar gróðurhúsalofttegunda innan Bandalagsins og um breytingu á tilskipun ráðsins 96/61/EB (Stjtíð. ESB L 275, 25.10.2003, bls. 32).

([3]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2004/39/EB frá 21. apríl 2004 um markaði fyrir fjármálagerninga og um breytingu á tilskipunum ráðsins 85/611/EBE og 93/6/EBE og tilskipun 2000/12/EB og um niðurfellingu á tilskipun ráðsins 93/22/EBE (Stjtíð. ESB L 145, 30.4.2004, bls. 1).

Til að viðhalda getu framkvæmdastjórnarinnar, aðildarríkjanna og annarra opinberlega tilnefndra aðila til að þróa og framkvæma loftslagsstefnu Sambandsins ætti starfsemi þessara opinberu aðila, að því marki sem hún fer fram í þágu almennings og eingöngu við framfylgd þessarar stefnu og varðandi losunarheimildir, að vera undanþegin beitingu þessar reglugerðar. Slík undanþága ætti ekki að hafa neikvæð áhrif á gagnsæi á markaði í heild þar sem þessir opinberu aðilar hafa lögbundnar skyldur til að starfa með hætti sem tryggir skipulega og sanngjarna miðlun og aðgang að, án mismununar, upplýsingum um nýjar ákvarðanir, þróun og gögn sem eru verðnæm í eðli sínu. Ráðstafanir til að vernda sanngjarna miðlun, án mismununar, á tilteknum verðnæmum upplýsingum sem opinber yfirvöld búa yfir eru auk þess til staðar í tilskipun 2003/87/EB og framkvæmdarráðstöfunum sem samþykktar eru samkvæmt henni. Á sama tíma ætti undanþágan fyrir opinbera aðila við framfylgd loftslagsstefnu Sambandsins ekki að ná yfir tilvik þar sem þessir opinberu aðilar aðhafast eða taka þátt í viðskiptum sem eru ekki til að framfylgja loftslagsstefnu Sambandsins eða þegar aðilar sem starfa fyrir þessa aðila aðhafast eða taka þátt í viðskiptum fyrir eigin reikning.

22) Samkvæmt 43. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins og framkvæmd alþjóðasamninga, sem gerðir eru samkvæmt sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins, bera framkvæmdastjórnin, aðildarríkin og aðrir opinberlega tilnefndir aðilar, m.a., ábyrgð á því að framfylgja sameiginlegu landbúnaðarstefnunni og sameiginlegu sjávarútvegsstefnunni. Við framkvæmd þessara skyldna geta þessir opinberu aðilar stundað starfsemi og gert ráðstafanir sem miða að því að stýra búvörumörkuðum og fiskveiðum, þ.m.t. með opinberri íhlutun, og beitt viðbótarinnflutningsgjöldum eða fellt þau tímabundið niður. Í ljósi gildissviðs þessarar reglugerðar, tiltekinna ákvæða hennar sem gilda um stundarsamninga um hrávörur sem hafa eða eru líklegir til að hafa áhrif á fjármálagerninga og fjármálagerninga sem eru háðir virði stundarsamninga um hrávörur og sem hafa, eða eru líklegir til að hafa, áhrif á stundarsamninga um hrávörur, er nauðsynlegt að tryggja að starfsemi framkvæmdastjórnarinnar, aðildarríkja og annarra aðila sem eru tilnefndir opinberlega til að framfylgja sameiginlegu landbúnaðarstefnunni og sameiginlegu sjávarútvegsstefnunni, sé ekki takmörkuð. Til að viðhalda getu framkvæmdastjórnarinnar, aðildarríkjanna og annarra opinberlega tilnefndra aðila til að þróa og framfylgja sameiginlegu landbúnaðarstefnunni og sameiginlegu sjávarútvegsstefnunni ætti starfsemi þeirra, að því marki sem hún fer fram í þágu almennings og eingöngu við framfylgd þessara stefna, að vera undanþegin beitingu þessar reglugerðar. Slík undanþága ætti ekki að hafa neikvæð áhrif á gagnsæi á markaði í heild þar sem þessir opinberu aðilar hafa lögbundnar skyldur til að starfa með hætti sem tryggir skipulega og sanngjarna miðlun og aðgang að, án mismununar, upplýsingum um nýjar ákvarðanir, þróun og gögn sem eru verðnæm í eðli sínu. Á sama tíma ætti undanþágan fyrir opinbera aðila við framfylgd sameiginlegu landbúnaðarstefnunnar og sameiginlegu sjávarútvegsstefnunnar ekki að ná yfir tilvik þar sem þessir opinberu aðilar aðhafast eða taka þátt í viðskiptum sem ekki eru til að framfylgja sameiginlegu landbúnaðarstefnunni og sameiginlegu sjávarútvegsstefnunni eða ef aðilar sem starfa fyrir þessa aðila aðhafast eða taka þátt í viðskiptum fyrir eigin reikning.

23) Aðaleinkenni innherjasvika er ósanngjarnt forskot sem fæst með innherjaupplýsingum í óhag þriðju aðila sem búa ekki yfir slíkum upplýsingum og grefur þannig undan heilleika fjármálamarkaða og tiltrú fjárfesta. Af þessum sökum ætti bannið við innherjasvikum að gilda þegar aðili sem býr yfir innherjaupplýsingum nýtir sér með óréttmætum hætti þær upplýsingar með því að eiga markaðsviðskipti í samræmi við þær upplýsingar með því að kaupa eða selja, reyna að kaupa eða selja, afturkalla eða breyta eða reyna að afturkalla eða breyta fyrirmælum um að kaupa eða selja, fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila, beint eða óbeint, fjármálagerninga sem upplýsingarnar varða. Notkun innherjaupplýsinga getur einnig falist í að eiga viðskipti með losunarheimildir og afleiður þeirra og að leggja fram tilboð á uppboðum losunarheimilda eða annarra uppboðsafurða sem grundvallast á þeim, sem eru geymdar samkvæmt reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1031/2010 ([1]).

24) Ef lögaðili eða einstaklingur sem býr yfir innherjaupplýsingum kaupir eða selur eða reynir að kaupa eða selja, fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila, beint eða óbeint, fjármálagerninga sem þessar upplýsingar varða ætti að gera ráð fyrir að viðkomandi hafi nýtt sér þær upplýsingar. Sú ályktun hefur ekki áhrif á rétt til varnar. Spurningin um hvort aðili hefur brotið bannið við innherjasvikum, eða hefur reynt að beita innherjasvikum, ætti að skoðast í ljósi tilgangsins með þessari reglugerð, sem er að vernda heilleika fjármálamarkaðarins og auka tiltrú fjárfesta, sem að sínu leyti byggist á fullvissu um að fjárfestar standi jafnfætis og njóti verndar fyrir misnotkun innherjaupplýsinga.

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1031/2010 frá 12. nóvember 2010 um tímasetningu, stjórnun og aðra þætti í tengslum við uppboð á heimildum til losunar gróðurhúsalofttegunda samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/87/EB um að koma á fót kerfi fyrir viðskipti með heimildir til losunar gróðurhúsalofttegunda innan Bandalagsins (Stjtíð. ESB L 302, 18.11.2010, bls. 1).

25) Fyrirmæli sem gefin eru áður en einstaklingur býr yfir innherjaupplýsingum ættu ekki að teljast vera innherjasvik. Ef einstaklingur fær innherjaupplýsingar ætti þó að ganga út frá þeirri forsendu að allar síðari breytingar tengdar þeim upplýsingum á fyrirmælum sem gefin voru áður en hann fékk slíkar upplýsingar, þ.m.t. afturköllun eða breyting á fyrirmælum eða tilraun til að afturkalla eða breyta fyrirmælum, teljist vera innherjasvik. Þó mætti falla frá þeirri forsendu ef einstaklingurinn sýnir fram á að hann eða hún hafi ekki nýtt innherjaupplýsingarnar við framkvæmd viðskiptanna.

26) Notkun innherjaupplýsinga getur falist í því að kaupa eða selja fjármálagerning, eða uppboðsafurð sem grundvallast á losunarheimildum, að afturkalla eða breyta fyrirmælum eða gera tilraun til að kaupa eða selja fjármálagerning eða afturkalla eða breyta fyrirmælum þegar sá sem það gerir veit, eða ætti að vita, að um innherjaupplýsingar er að ræða. Í þessu sambandi ættu lögbær yfirvöld taka afstöðu til þess sem eðlilegur og sanngjarn einstaklingur veit eða hefði átt að vita við tilteknar aðstæður.

27) Þessa reglugerð ber að túlka á þann hátt sem samræmist ráðstöfununum sem aðildarríkin hafa samþykkt í því skyni að vernda hagsmuni eigenda framseljanlegra verðbréfa sem hafa atkvæðisrétt í félagi (eða gætu fengið slíkan rétt í framhaldi af beitingu réttar eða eignabreytingu) þegar félagið er viðfang í almennu yfirtökutilboði eða aðrar breytingar eru fyrirhugaðar á yfirráðum félagsins. Einkum skal túlka þessa reglugerð á þann hátt sem samræmist lögum og stjórnsýslufyrirmælum sem samþykkt hafa verið í tengslum við yfirtökutilboð, samruna og önnur viðskipti sem hafa áhrif á eignarhald eða yfirráð yfir félögum sem falla undir eftirlit eftirlitsyfirvalda sem aðildarríki hafa tilnefnt skv. 4. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/25/EB ([1]).

28) Rannsóknir og áætlanir sem byggjast á gögnum sem eru öllum aðgengileg ættu, einar og sér, ekki að teljast innherjaupplýsingar og það að viðskipti fari fram á grundvelli slíkra rannsókna eða áætlana ætti því ekki teljast notkun innherjaupplýsinga. Þó geta slíkar upplýsingar talist vera innherjaupplýsingar t.d. ef markaðurinn væntir reglulegrar birtingar eða dreifingar upplýsinga og ef slík birting eða dreifing á þátt í verðmyndun fjármálagerninga eða ef upplýsingarnar fela í sér álit viðurkennds markaðslýsanda eða stofnunar sem getur haft áhrif á verð á tengdum fjármálagerningum. Markaðsaðilar skulu því taka til athugunar að hvaða marki upplýsingarnar eru óopinberar og möguleg áhrif þeirra á fjármálagerninga, sem viðskipti eru með fyrir birtingu þeirra eða dreifingu, til að ákvarða hvort þeir væru að eiga viðskipti á grundvelli innherjaupplýsinga.

29) Til að komast hjá því að banna fyrir slysni tiltekna fjármálastarfsemi sem er lögmæt, þ.e.a.s. ef ekki er um að ræða áhrif af markaðssvikum, er nauðsynlegt að viðurkenna tiltekna lögmæta hegðun. Þetta getur t.d. verið viðurkenning á hlutverki viðskiptavaka er þeir beita lögmætum heimildum sínum til að stuðla að seljanleika á markaði.

30) Það að viðskiptavakar eða einstaklingar, sem hafa heimild til að koma fram sem mótaðilar takmarki sig við lögmæta starfsemi við kaup og sölu fjármálagerninga, eða það að einstaklingar, sem hafa heimild til að framkvæma fyrirmæli fyrir hönd þriðju aðila sem búa yfir innherjaupplýsingum, takmarki sig við að framkvæma, afturkalla eða breyta fyrirmælum samviskusamlega, ætti í sjálfu sér ekki teljast vera notkun upplýsinga. Verndin sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð fyrir viðskiptavaka, aðila sem hafa heimild til að koma fram sem mótaðilar eða einstaklinga sem hafa heimild til að framkvæma fyrirmæli fyrir hönd þriðju aðila sem búa yfir innherjaupplýsingum nær þó ekki yfir athæfi sem er bannað með skýrum hætti samkvæmt þessari reglugerð, þ.m.t. svo dæmi sé tekið það sem almennt er kallað „framhjáhlaupsviðskipti“ (e. *front-running*). Hafi lögaðilar gert allar réttmætar ráðstafanir til að koma í veg fyrir markaðssvik en einstaklingar, í starfi sínu, stunda samt markaðssvik fyrir hönd lögaðilans ætti það ekki að teljast markaðssvik lögaðilans. Annað dæmi sem ætti ekki að teljast notkun innherjaupplýsinga eru viðskipti sem gerð eru til að uppfylla fyrri skuldbindingu sem er gjaldfallin. Það eitt að hafa aðgang að innherjaupplýsingum um annað félag og nota þær í tengslum við almennt yfirtökutilboð í því skyni að ná yfirráðum í því félagi eða leggja til samruna við það ætti ekki að teljast vera innherjasvik.

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2004/25/EB frá 21. apríl 2004 um yfirtökutilboð (Stjtíð. ESB L 142, 30.4.2004, bls. 12).

31) Þar eð undanfari að kaupum og sölu fjármálagerninga hlýtur að vera ákvörðun um kaup eða sölu sem einstaklingur sem sér um viðskiptin tekur ætti það eitt að kaupin eða salan fari fram ekki teljast notkun innherjaupplýsinga. Aðgerðir á grundvelli eigin skipulags og áætlana um viðskipti ættu ekki að teljast vera notkun innherjaupplýsinga. Enginn þessara lögaðila eða einstaklinga ætti þó að njóta verndar í krafti starfssviðs síns; þeir ættu aðeins að njóta verndar ef þeir starfa á réttan og tilhlýðilegan hátt og uppfylla bæði þau viðmið sem vænst er í starfi þeirra og viðmið þessarar reglugerð, þ.e. heilleika markaðar og fjárfestavernd. Samt sem áður mætti líta svo á að brot hafi verið framið ef lögbært yfirvald sýnir fram á ólögmæta ástæðu fyrir þessum viðskiptum, fyrirmælum eða hegðun eða að einstaklingurinn hafi notað innherjaupplýsingar.

32) Markaðsþreifingar eru samskipti milli seljanda fjármálagerninga og eins eða fleiri mögulegra fjárfesta, áður en tilkynning um viðskipti er gefin, til að meta áhuga mögulegra fjárfesta á hugsanlegum viðskiptum og verðlagningu þeirra, umfangi og uppbyggingu. Markaðsþreifingar gætu falið í sér frumútboð verðbréfa eða útboð verðbréfa á eftirmarkaði sem er aðgreint frá venjulegum viðskiptum. Þær eru afar dýrmætt tæki til að leggja mat á álit mögulegra fjárfesta, auka samskipti við hluthafa, tryggja að samningar gangi snurðulaust fyrir sig og samræma sjónarmið útgefenda, þeirra hluthafa sem fyrir eru og mögulegra nýrra fjárfesta. Þær geta verið sérstaklega gagnlegar þegar skortur er á tiltrú á markaði eða viðeigandi viðmiðun, eða ef markaðir eru óstöðugir. Getan til að framkvæma markaðsþreifingar er því mikilvæg fyrir eðlilega starfsemi fjármálamarkaða og ekki ætti að líta á markaðsþreifingar sem slíkar sem markaðssvik.

33) Dæmi um markaðsþreifingar eru aðstæður þar sem fyrirtækið á söluhliðinni hefur átt í viðræðum við útgefanda um möguleg viðskipti og það hefur ákveðið að meta mögulegan áhuga fjárfesta til að ákvarða skilmála viðskipta; þar sem útgefandi hefur í hyggju að tilkynna um útgáfu á skuldabréfum eða viðbótarhlutafjárútboð og fyrirtæki á söluhliðinni hefur samband við lykilfjárfesta og gefur þeim upp alla skilmála samkomulags til að fá þá til að skuldbinda sig til að taka þátt í viðskiptunum; eða þar sem söluhliðin hyggst selja mikinn fjölda verðbréfa fyrir hönd fjárfestis og leitast við að meta mögulegan áhuga annarra mögulegra fjárfesta á þessum verðbréfum.

34) Þegar markaðsþreifingar eiga sér stað kann að vera nauðsynlegt að miðla innherjaupplýsingum til mögulegra fjárfesta. Almennt mun aðeins vera mögulegt að hagnast fjárhagslega á viðskiptum á grundvelli innherjaupplýsinga sem veittar eru við markaðsþreifingu ef þegar er til staðar markaður með fjármálagerninginn sem var tilefni markaðsþreifingarinnar eða með tengdan fjármálagerning. Vegna tímasetningar slíkra viðræðna er mögulegt að innherjaupplýsingum verði miðlað til mögulegra fjárfesta í markaðsþreifingarferlinu eftir að fjármálagerningur hefur verið tekinn til viðskipta á skipulegum markaði eða viðskipti hafa verið með hann á markaðstorgi fjármálagerninga eða skipulegu markaðstorgi. Áður en markaðsþreifingar fara fram ætti markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum að leggja mat á það hvort markaðsþreifingarnar muni fela í sér miðlun innherjaupplýsinga.

35) Miðlun innherjaupplýsinga ætti að teljast lögmæt ef hún fer fram í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur aðila. Ef markaðsþreifing felur í sér miðlun innherjaupplýsinga telst hún fara fram í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur markaðsaðilans sem miðlar upplýsingunum ef hann, þegar upplýsingunum er miðlað, upplýsir og fær samþykki þess sem fær upplýsingarnar á að mögulega gæti verið um innherjaupplýsingar að ræða, að ákvæði þessarar reglugerðar takmarki að hann geti átt viðskipti eða aðhafst á grundvelli þessara upplýsinga, að gera skuli réttmætar ráðstafanir til að vernda áframhaldandi trúnað og að hann verði að upplýsa markaðsaðilann sem miðlaði upplýsingunum um alla einstaklinga og lögaðila sem upplýsingunum er miðlað til við þróun svara við markaðsþreifingunni. Sá markaðsaðili sem miðlar upplýsingunum ætti einnig að uppfylla skyldurnar sem settar verða fram með ítarlegum hætti í tæknilegum eftirlitsstöðlum og varða viðhald skráa yfir upplýsingar sem veittar eru. Ekki skal gera ráð fyrir að markaðsaðilar sem ekki fara að þessari reglugerð er þeir framkvæma markaðsþreifingar hafi með ólögmætum hætti miðlað innherjaupplýsingum en þeir ættu ekki að geta notið undanþágunnar sem veitt er þeim sem hafa hlítt slíkum ákvæðum Spurningin um hvort þeir hafi brotið bannið við ólögmætri miðlun innherjaupplýsinga ætti að skoðast í ljósi allra viðeigandi ákvæða þessarar reglugerðar og allir markaðsaðilar sem miðla upplýsingum ættu að vera skyldugir til að leggja mat sitt fram skriflega áður en þeir taka þátt í markaðsþreifingu, hvort sem sú markaðsþreifing felur í sér miðlun innherjaupplýsinga eða ekki.

36) Mögulegir fjárfestar sem markaðsþreifing beinist að ættu af sinni hálfu að taka til athugunar hvort þær upplýsingar sem miðlað er til þeirra flokkist sem innherjaupplýsingar sem myndi banna þeim að eiga viðskipti á grundvelli þeirra eða miðla þeim til annarra. Mögulegir fjárfestar lúta áfram reglunum um innherjasvik og ólögmæta miðlun innherjaupplýsinga sem settar eru fram í þessari reglugerð. Til að aðstoða mögulega fjárfesta við athuganir þeirra og að því er varðar hvaða skref skuli taka til að brjóta ekki í bága við þessa reglugerð ætti Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin að gefa út viðmiðunarreglur.

37) Í reglugerð (ESB) nr. 1031/2010 er kveðið á um tvennar samhliða reglur um markaðssvik sem gilda um uppboð á losunarheimildum. Í kjölfar þess að losunarheimildir eru flokkaðar sem fjármálagerningar ætti þessi reglugerð þó að mynda sameiginlegar heildarreglur um ráðstafanir vegna markaðssvika sem gilda um alla frum- og eftirmarkaði með losunarheimildir. Þessi reglugerð ætti einnig að gilda um hegðun eða viðskipti, þ.m.t. tilboð, í tengslum við uppboð á uppboðsvettvangi sem hefur starfsleyfi sem skipulegur markaður með losunarheimildir eða aðrar uppboðsafurðir sem grundvallast á þeim, þ.m.t. ef uppboðsafurðir eru ekki fjármálagerningar, samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010.

38) Þessi reglugerð ætti að kveða á um ráðstafanir sem varða markaðsmisnotkun og unnt er að laga að nýjum viðskiptaháttum eða nýjum áætlunum sem gætu talist misnotkun. Til að endurspegla þá staðreynd að viðskipti með fjármálagerninga fara í auknum mæli fram með sjálfvirkum hætti er æskilegt að í skilgreiningunni á markaðsmisnotkun séu tilgreind dæmi um tilteknar misnotkunaráætlanir sem unnt er að beita með tiltækum viðskiptaaðferðum, þ.m.t. algríms- og hátíðniviðskiptum. Þessum dæmum er hvorki ætlað að vera tæmandi né ætlað að gefa í skyn að þessar sömu áætlanir, framkvæmdar með öðrum aðferðum, myndu ekki einnig teljast misnotkun.

39) Bannið við markaðssvikum ætti einnig að gilda um þá aðila sem eru í samstarfi í þeim tilgangi að stunda markaðssvik. Dæmi gætu tekið til, en ekki takmarkast við, miðlara sem eiga hugmynd að og ráðleggja viðskiptaáætlun sem ætluð er til að leiða til markaðssvika, aðila sem hvetja aðila sem býr yfir innherjaupplýsingum til að miðla þeim með ólögmætum hætti eða aðila sem þróa hugbúnað í samstarfi við fjárfesti í þeim tilgangi að auðvelda markaðssvik.

40) Til að tryggja að ábyrgð lendi bæði á lögaðilanum og hverjum þeim einstaklingi sem tekur þátt í ákvarðanatöku lögaðilans er nauðsynlegt að viðurkenna mismunandi lagakerfi í einstökum aðildarríkjum. Slík kerfi ættu að tengjast beint aðferðum við ákvörðun ábyrgðar í landslögum.

41) Til viðbótar við bannið við markaðsmisnotkun ætti þessi reglugerð að innihalda bann við því að gera tilraun til að taka þátt í markaðsmisnotkun. Tilraun til að taka þátt í markaðsmisnotkun ætti að aðgreina frá hegðun sem er líkleg til að leiða til markaðsmisnotkunar þar sem bæði tilvikin eru bönnuð samkvæmt þessari reglugerð. Slík tilraun gæti náð yfir aðstæður þar sem aðgerðin er hafin en er ekki lokið, t.d. vegna tæknilegra erfiðleika eða fyrirmæla um viðskipti sem ekki hefur verið brugðist við. Bann við tilraunum til að taka þátt í markaðsmisnotkun er nauðsynlegt til að gera lögbærum yfirvöldum kleift að beita viðurlögum við slíkum tilraunum.

42) Án þess að hafa áhrif á markmiðið með þessari reglugerð og þau ákvæði hennar sem taka gildi án frekari lögfestingar, gæti aðili, sem á í viðskiptum eða gefur fyrirmæli um viðskipti sem gætu talist markaðsmisnotkun, sýnt fram á að ástæður hans fyrir slíkum viðskiptum eða fyrirmælum um viðskipti séu lögmætar og að viðskiptin og fyrirmælin séu í samræmi við viðurkennda venju á viðkomandi markaði. Aðeins lögbær yfirvöld sem bera ábyrgð á eftirliti með markaðssvikum á viðkomandi markaði er heimilt að viðurkenna markaðsframkvæmd. Framkvæmd sem viðurkennd er á tilteknum markaði telst ekki viðeigandi á öðrum mörkuðum nema lögbær yfirvöld slíkra markaða hafa opinberlega samþykkt þá framkvæmd. Samt sem áður gæti brot talist hafa átt sér stað ef lögbært yfirvald sýnir fram á að ólögleg ástæða sé fyrir þessum viðskiptum eða um viðskipti.

43) Þessi reglugerð ætti einnig að skýra að þátttaka í markaðsmisnotkun eða tilraun til að taka þátt í markaðsmisnotkun með fjármálagerning gæti verið með þeim hætti að notaðir væru tengdir fjármálagerningar á borð við afleiðugerninga sem viðskipti eru með á öðrum viðskiptavettvangi eða OTC-afleiðugerninga.

44) Margir fjármálagerningar eru verðlagðir með vísan til viðmiðunargilda. Raunveruleg misnotkun eða tilraun til misnotkunar á viðmiðunargildum, þ.m.t. millibankavöxtum, getur haft alvarleg áhrif á tiltrú á markaði og getur leitt til verulegs taps fyrir fjárfesta eða raskað raunhagkerfinu. Því er nauðsynlegt að setja sértæk ákvæði í tengslum við viðmiðunargildi til að vernda heilleika markaðanna og til að tryggja að lögbær yfirvöld geti framfylgt skýru banni við misnotkun viðmiðunargilda. Þessi ákvæði ættu að ná yfir öll birt viðmiðunargildi, þ.m.t. þau sem eru aðgengileg á netinu hvort sem þau eru án endurgjalds eða ekki, t.d. viðmiðunargildi skuldatryggingar og vísitöluvísitölur. Nauðsynlegt er að bæta við almenna bannið við markaðsmisnotkun með því að banna hagræðingu á sjálfu viðmiðunargildinu og sendingu rangra eða villandi upplýsinga, veitingu rangra eða villandi inntaksgagna eða aðrar aðgerðir sem hagræða útreikningi viðmiðunargildis, ef útreikningurinn hefur svo víðtæka skilgreiningu að hann innihaldi móttöku og mat á öllum gögnum sem tengjast útreikningi á því viðmiðunargildi og innihaldi einkum aðlöguð gögn, og að meðtalinni aðferðafræði sem á við um viðmiðunargildið, hvort sem hún er á grundvelli algríms eða dómgreindar að hluta til eða að öllu leyti. Þessar reglur eru til viðbótar við reglugerð (ESB) nr. 1227/2011 sem leggur bann við að veita fyrirtækjum sem gera verðmat eða markaðsskýrslur um heildsöluorkuafurðir viljandi rangar upplýsingar sem villir um fyrir markaðsaðilum sem bregðast við á grundvelli verðmatsins eða markaðsskýrslnanna.

45) Til að tryggja samræmd markaðsskilyrði milli viðskiptavettvanga og fyrirtækja sem falla undir þessa reglugerð ættu allir aðilar sem reka skipulega markaði, markaðstorg fjármálagerninga og skipuleg markaðstorg að þurfa að koma á fót og viðhalda skilvirku fyrirkomulagi, kerfum og verklagi sem miðar að því að koma í veg fyrir og greina markaðsmisnotkun og misnotkunaraðgerðir.

46) Misnotkun eða tilraun til misnotkunar á fjármálagerningum getur einnig falist í því að setja fram fyrirmæli sem ekki er víst að verði framkvæmd. Þar að auki er mögulegt að misnota fjármálagerning með hegðun utan viðskiptavettvangs. Aðilar sem koma á eða framkvæma viðskipti í atvinnuskyni ættu að þurfa að koma á fót og viðhalda skilvirku fyrirkomulagi, kerfum og verklagi til að greina og tilkynna grunsamleg viðskipti. Þeir ættu einnig að tilkynna grunsamleg fyrirmæli og grunsamleg viðskipti sem fara fram utan viðskiptavettvangs.

47) Misnotkun eða tilraun til misnotkunar fjármálagerninga getur einnig falist í að dreifa röngum eða villandi upplýsingum. Dreifing rangra eða villandi upplýsinga getur haft veruleg áhrif á verð fjármálagerninga á tiltölulega skömmum tíma. Hún getur falist í að spinna upp bersýnilega rangar upplýsingar en einnig að sleppa viljandi mikilvægum staðreyndum, auk þess að veita vísvitandi ónákvæmar upplýsingar. Þess konar markaðsmisnotkun er sérstaklega skaðleg fjárfestum þar sem hún veldur því að þeir byggja fjárfestingarákvarðanir sínar á röngum eða brengluðum upplýsingum. Það er einnig skaðlegt fyrir útgefendur þar sem það dregur úr trausti á þeim upplýsingum sem aðgengilegar eru í tengslum við þá. Skortur á tiltrú á markaði getur teflt í tvísýnu getu útgefanda til að gefa út nýja fjármálagerninga eða til að tryggja sér lánsfé frá öðrum markaðsaðilum til að fjármagna starfsemi sína. Upplýsingar berast mjög hratt um markaðinn. Þar af leiðandi getur tjón fjárfesta og útgefanda varað í tiltölulega langan tíma þar til í ljós kemur að upplýsingarnar eru rangar eða villandi og útgefandinn eða sá sem ber ábyrgð á að dreifa þeim getur leiðrétt þær. Af þessum sökum er nauðsynlegt að flokka dreifingu rangra eða villandi upplýsinga, þ.m.t. það að breiða út sögusagnir og rangar eða misvísandi fréttir, sem brot gegn þessari reglugerð. Því ættu þeir sem eru virkir á fjármálamörkuðum ekki að mega veita að vild upplýsingar gegn eigin áliti eða dómgreind, sem þeir vita eða ættu að vita að eru rangar eða misvísandi, fjárfestum og útgefendum í óhag.

48) Þar sem notkun vefsetra, blogga og samfélagsmiðla hefur aukist er mikilvægt að skýra að dreifing rangra eða villandi upplýsinga á netinu, þ.m.t. á samfélagsmiðlum eða nafnlausum bloggsíðum, ætti, að því er varðar þessa reglugerð, að teljast jafngild dreifingu með hefðbundnari samskiptaleiðum.

49) Opinber birting innherjaupplýsinga af hálfu útgefanda er nauðsynleg til að koma í veg fyrir innherjasvik og til að tryggja að fjárfestar séu ekki blekktir. Útgefendum ætti því að vera skylt að upplýsa almenning, eins fljótt og mögulegt er, um innherjaupplýsingar. Þessi skylda gæti þó, við sérstakar aðstæður, skaðað lögmæta hagsmuni útgefandans. Við slíkar aðstæður ætti að heimila frestun birtingar að því tilskildu að frestunin væri ekki líkleg til að villa um fyrir almenningi og útgefandinn geti tryggt trúnað um upplýsingarnar. Útgefandinn er aðeins skyldugur til að birta innherjaupplýsingar ef hann hefur óskað eftir eða leyft töku fjármálagerningsins til viðskipta.

50) Við beitingu krafnanna um opinbera birtingu innherjaupplýsinga og frestun á slíkri opinberri birtingu, eins og kveðið er á um í þessari reglugerð, geta lögmætir hagsmunir einkum varðað eftirfarandi aðstæður, þótt upptalningin sé ekki tæmandi: (a) yfirstandandi samningaviðræður, eða svipaðar aðstæður, þar sem opinber birting gæti haft áhrif á niðurstöðu eða eðlilegan gang viðræðnanna. Einkum ef fjárhagsafkoma útgefanda er í alvarlegri og yfirvofandi hættu, án þess að það falli undir gildandi lög um gjaldþrot, er hægt að fresta opinberri birtingu upplýsinga í takmarkaðan tíma ef birtingin kynni að tefla hagsmunum hluthafa og hugsanlegra hluthafa í tvísýnu með því að draga úr líkum þess að unnt sé að leiða til lykta tilteknar samningaviðræður sem eiga að tryggja fjárhagslega endurreisn útgefandans til langs tíma, (b) ákvarðanir sem stjórn útgefanda hefur tekið eða samningar sem hún hefur gert útheimta samþykki annarrar einingar hjá útgefanda til að öðlast gildi, krefjist skipulag útgefandans þess að þessar einingar séu aðskildar, að því tilskildu að opinber birting upplýsinganna, áður en slíkt samþykki er veitt, ásamt tilkynningu um að samþykkis sé enn beðið kynni að hafa í för með sér hættu á að almenningur geti ekki metið upplýsingarnar rétt.

51) Þar að auki þarf að beina kröfunni um miðlun innherjaupplýsinga til þátttakenda á markaði með losunarheimildir. Til að komast hjá því að markaðnum berist tilkynningar sem eru ekki til gagns og til að viðhalda kostnaðarhagkvæmni fyrirhugaðra ráðstafana virðist vera nauðsynlegt að láta regluna um þessa kröfu eingöngu hafa áhrif á þá rekstraraðila viðskiptakerfis ESB fyrir losunarheimildir sem ætla má að geti, í krafti stærðar sinnar og starfsemi, haft marktæk áhrif á verð losunarheimilda, uppboðsafurða sem grundvallast á þeim eða afleiddra fjármálagerninga í tengslum við þær og á tilboð á uppboðum samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010. Framkvæmdastjórnin ætti að samþykkja ráðstafanir til að koma á lágmarksmörkum í þeim tilgangi að beita þeirri undanþágu með framseldri gerð. Upplýsingarnar sem skal miðla ættu að varða raunlæga starfsemi aðilans sem miðlar upplýsingunum en ekki áætlanir hans eða stefnur um viðskipti með losunarheimildir, uppboðsvörur sem grundvallast á þeim eða afleidda fjármálagerninga í tengslum við þær. Ef þátttakendur á markaði með losunarheimildir uppfylla nú þegar jafngildar kröfur um miðlun innherjaupplýsinga, einkum í samræmi við reglugerð (ESB) nr. 1227/2011, ætti skyldan að miðla innherjaupplýsingum um losunarheimildir ekki að valda tvítekningu skyldubundinnar miðlunar upplýsinga sem eru að mestu um sama efni. Sé um að ræða þátttakendur á markaðnum með losunarheimildir með samanlagða losun eða nafnvarmaafl við eða undir settum viðmiðunarmörkum, þar sem upplýsingarnar um raunlæga starfsemi þeirra teljast ekki vera mikilvægar með tilliti til miðlunar, ætti hún sömuleiðis ekki að teljast hafa marktæk áhrif á verð losunarheimilda, uppboðsvara sem grundvallast á þeim og afleiddra fjármálagerninga í tengslum við þær. Slíkir þátttakendur á markaðnum með losunarheimildir ættu þrátt fyrir það að falla undir bann við innherjasvikum í tengslum við allar aðrar upplýsingar sem þeir hafa aðgang að og flokkast sem innherjaupplýsingar.

52) Til að vernda hagsmuni almennings, viðhalda stöðugleika fjármálakerfisins og t.d. til að komast hjá því að lausafjárvandi fjármálastofnana verði að greiðsluvanda vegna skyndilegrar úttektar á fjármagni, getur verið rétt að heimila, við sérstakar aðstæður, frestun á opinberri birtingu innherjaupplýsinga af hálfu lánastofnana eða fjármálastofnana. Sér í lagi gæti þetta átt við um upplýsingar sem tengjast tímabundum lausafjárerfiðleikum, ef þær þurfa að fá lán hjá seðlabanka, þ.m.t. lausafjárfyrirgreiðslu í neyð frá seðlabanka, þar sem miðlun upplýsinganna myndi hafa kerfislæg áhrif. Skilyrði þessarar frestunar ætti að vera að útgefandinn fái samþykki viðkomandi lögbærs yfirvalds og að það sé skýrt að hagsmunir almennings af frestun birtingar og efnahagsleg þýðing hennar vegi þyngra en hagsmunir markaðarins að fá upplýsingarnar sem falla undir frestunina.

53) Að því er varðar fjármálastofnanir, einkum ef þær fá lán hjá seðlabanka, þ.m.t. lausafjárfyrirgreiðslu í neyð, ætti lögbært yfirvald, að höfðu samráði við, eins og við á, seðlabanka viðkomandi lands, þjóðhagsvarúðaryfirvald eða annað viðeigandi landsyfirvald, að framkvæma matið á því hvort upplýsingarnar séu kerfislega mikilvægar og hvort frestun á birtingu sé í þágu almennings.

54) Skýrt bann ætti að vera við notkun innherjaupplýsinga eða tilraun til að nota innherjaupplýsingar til að eiga viðskipti fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila. Notkun innherjaupplýsinga getur einnig falið í sér viðskipti með losunarheimildir og afleiður og tilboðsgjöf á uppboðum á losunarheimildum eða öðrum uppboðsvörum sem grundvallast á þeim, sem eru geymdar samkvæmt reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1031/2010, af hálfu aðila sem vita, eða ættu að vita, að upplýsingarnar sem þeir búa yfir gætu verið innherjaupplýsingar. Upplýsingar um eigin áætlanir og stefnur markaðsaðila um viðskipti ættu ekki að teljast innherjaupplýsingar, þrátt fyrir að upplýsingar um áætlanir og stefnur þriðja aðila geti talist innherjaupplýsingar.

55) Krafan um opinbera birtingu innherjaupplýsinga getur verið íþyngjandi fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki, eins og þau eru skilgreind í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2014/65/ESB ([1]), sem hafa fengið fjármálagerninga sína tekna til viðskipta á vaxtarmörkuðum fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki, vegna kostnaðar við að vakta upplýsingar í vörslu þeirra og vegna lögfræðiráðgjafar um það hvort og hvenær birta þarf upplýsingarnar. Tafarlaus birting innherjaupplýsinga er þó nauðsynleg til að tryggja tiltrú fjárfesta á þessum útgefendum. Því ætti Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin að geta gefið út leiðbeiningar til að hjálpa útgefendum að uppfylla skylduna um að birta innherjaupplýsingar án þess að stofna vernd fjárfesta í hættu.

56) Innherjalistar eru mikilvægt tæki fyrir eftirlitsaðila er þeir rannsaka möguleg markaðssvik en mismunur milli landa að því er varðar gögn sem skulu vera á þessum listum getur lagt óþarfa stjórnsýslubyrði á útgefendur. Gagnareitir innherjalista ættu því að vera samræmdir til að draga úr þeim kostnaði. Nauðsynlegt er að aðilar sem eru skráðir á innherjalista séu upplýstir um það og afleiðingar þess samkvæmt þessari reglugerð og tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2014/57/ESB ([2]). Krafan um að halda og uppfæra stöðugt innherjalista leggur einkum stjórnsýslubyrði á útgefendur á vaxtarmörkuðum lítilla og meðalstórra fyrirtækja. Þar sem lögbær yfirvöld geta haft skilvirkt eftirlit með markaðssvikum án þess að hafa þessa lista alltaf til taks fyrir þessa útgefendur, ættu þeir að vera undanþegnir þessari skyldu til að draga úr þeim stjórnsýslukostnaði sem felst í þessari reglugerð. Slíkir útgefendur ættu þó að leggja fram innherjalista samkvæmt beiðni lögbærra yfirvalda.

57) Að útgefendur, eða einstaklingar sem koma fram fyrir þeirra hönd eða þeirra reikning, taki saman lista yfir einstaklinga sem starfa fyrir þá samkvæmt ráðningarsamningi eða með öðrum hætti og hafa aðgang að innherjaupplýsingum sem tengjast útgefandanum beint eða óbeint, er gagnleg ráðstöfun til að vernda heilleika markaðar. Slíkir listar geta komið sér vel fyrir útgefendur eða slíka einstaklinga til að stýra flæði innherjaupplýsinga og þannig hjálpað þeim að sinna trúnaðarskyldum sínum. Slíkir listar geta líka verið nytsamlegt tæki fyrir lögbær yfirvöld til að auðgreina aðila sem hafa aðgang að innherjaupplýsingum og dagsetninguna þegar þeir fengu aðgang. Aðgangur aðilanna sem eru á slíkum lista að innherjaupplýsingum, sem beint eða óbeint tengjast útgefandanum, hefur ekki áhrif á þau bönn sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð.

58) Aukið gagnsæi í viðskiptum aðila sem gegna stjórnunarstörfum hjá útgefendum og, ef við á, einstaklinga sem eru nákomnir þeim fyrrnefndu, getur verið fyrirbyggjandi að því er varðar markaðssvik, einkum innherjasvik. Þá getur birting þessara viðskipta, a.m.k. í einstökum tilvikum, veitt fjárfestum afar mikilvægar upplýsingar. Nauðsynlegt er að skýra að skyldan til að birta upplýsingar um viðskipti þessara stjórnenda nær einnig yfir veðsetningu á eða lánveitingu fjármálagerninga þar sem veðsetning hlutabréfa getur haft veruleg og mögulega raskandi áhrif á fyrirtækið ef um er að ræða skyndilega, ófyrirséða sölu. Án upplýsingamiðlunar myndi markaðurinn ekki vita að aukinn möguleiki væri t.d. á verulegri breytingu á eignarhaldi hlutabréfa í framtíðinni, aukningu á framboði hlutabréfa á markaði eða að atkvæðisréttur í því fyrirtæki tapist. Af þeim sökum er krafist tilkynningar samkvæmt þessari reglugerð ef veðsetning verðbréfanna er hluti af stærri viðskiptum þar sem stjórnandinn setur verðbréfin sem tryggingu til að fá lán frá þriðja aðila. Þar að auki er fullt og eðlilegt gagnsæi á markaði forsenda fyrir tiltrú á markaðsaðilum og sér í lagi tiltrú hluthafa fyrirtækis. Einnig er nauðsynlegt að skýra að sú skylda að birta viðskipti þessara stjórnenda nær einnig yfir viðskipti annars aðila sem beitir eigin mati fyrir hönd stjórnandans. Til að tryggja viðeigandi jafnvægi milli gagnsæisstigs og fjölda tilkynninga sem skal senda lögbærum yfirvöldum og birta almenningi, ætti í þessari reglugerð að setja viðmiðunarmörk sem ekki þarf að tilkynna viðskipti undir.

59) Tilkynningar um viðskipti einstaklinga, sem gegna stjórnunastörfum, fyrir eigin reikning eða einstaklings sem er nákominn þeim fyrrnefndu eru ekki einungis dýrmætar upplýsingar fyrir markaðsaðila heldur eru einnig viðbótarúrræði fyrir lögbær yfirvöld til að hafa eftirlit með mörkuðum. Sú skylda að tilkynna um viðskipti hefur ekki áhrif þau bönn sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð.

60) Tilkynning um viðskipti ætti að vera í samræmi við reglur um miðlun persónuupplýsinga sem mælt er fyrir um í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 95/46/EB ([3]).

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2014/65/ESB frá 15. maí 2014 um markaði fyrir fjármálagerninga og um breytingu á tilskipun 2002/92/EB og tilskipun 2011/67/ESB (Stjtíð. ESB L 173, 12.6.2014, bls. 349).

([2]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2014/57/ESB frá 16. apríl 2014 um refsiviðurlög gegn markaðssvikum (tilskipunin um markaðssvik) (Stjtíð. ESB L 173, 12.6.2014, bls. 179).

([3]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 95/46/EB frá 24. október 1995 um vernd einstaklinga í tengslum við vinnslu persónuupplýsinga og um miðlun slíkra upplýsinga (Stjtíð. EB L 281, 23.11.1995, bls. 31).

61) Banna ætti aðilum sem gegna stjórnunarstörfum að eiga viðskipti fyrir birtingu árshlutareikningsskila eða ársskýrslu sem viðkomandi útgefanda er skylt að birta opinberlega samkvæmt reglum viðskiptavettvangsins þar sem hlutabréf útgefandans hafa verið tekin til viðskipta eða samkvæmt landslögum, nema sérstakar og takmarkaðar aðstæður séu fyrir hendi sem myndu réttlæta að útgefandinn heimilaði aðila sem gegnir stjórnunarstörfum að eiga viðskipti. Slík heimild frá útgefanda hefur þó ekki áhrif á þau bönn sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð.

62) Skilvirkt eftirlit er tryggt ef lögbært yfirvald í hverju aðildarríki ræður yfir skilvirkum tækjum, heimildum og fjármagni. Til samræmis við það kveður þessi reglugerð sérstaklega á um lágmarkseftirlits- og rannsóknarvald sem fela ætti lögbærum yfirvöldum aðildarríkja í samræmi við landslög. Þessu valdi ætti að beita þegar gerð er krafa um slíkt í landslögum, með því að leita til dómsyfirvalda. Þegar lögbær yfirvöld beita valdheimildum sínum samkvæmt þessari tilskipun ættu þau að gera það á hlutlægan og óhlutdrægan hátt og vera sjálfstæð í ákvarðanatöku sinni

63) Markaðsfyrirtæki og allir rekstraraðilar ættu einnig að stuðla að heilleika markaðarins. Að því leyti ætti tilnefning eins lögbærs yfirvalds vegna markaðssvika ekki að útiloka að um samstarf geti verið að ræða eða að deila beri ábyrgð lögbærs yfirvalds milli þess yfirvalds og markaðsfyrirtækja til að tryggja skilvirkt eftirlit með því að ákvæðunum í þessari reglugerð sé fylgt. Þegar aðilar sem setja saman eða dreifa fjárfestingarráðleggingum eða öðrum upplýsingum sem fela í sér ráðleggingu eða tillögu um fjárfestingaráætlun í einum eða fleiri fjármálagerningum, eiga einnig sjálfir í viðskiptum fyrir eigin reikning með slíka gerninga ættu lögbær yfirvöld, m.a., að geta farið fram á eða krafist upplýsinga frá slíkum aðilum, sem nauðsynlegar eru til að ákvarða hvort ráðleggingarnar, sem settar eru saman eða miðlað af þeim aðila, séu í samræmi við þessa reglugerð.

64) Í þeim tilgangi að greina innherjasvik og markaðsmisnotkun er nauðsynlegt að lögbær yfirvöld eigi, í samræmi við landslög, rétt á aðgangi að húsnæði einstaklinga og lögaðila til að leggja hald á gögn. Aðgangur að slíku húsnæði er nauðsynlegur ef réttmætur grunur er um að skjöl og önnur gögn í tengslum við viðfangsefni rannsóknar finnist og geti skipt máli til að sanna að um innherjasvik eða markaðssvik sé að ræða. Auk þess er nauðsynlegt að komast inn í slíkt húsnæði þegar aðilinn sem þegar hefur verið krafinn um upplýsingar uppfyllir ekki þá kröfu, að öllu leyti eða að hluta, eða þegar rökstuddur grunur er til að ætla að ef þeirra væri krafist yrði því ekki sinnt eða að skjölin eða upplýsingarnar, sem krafan um upplýsingar á við um, væru fjarlægðar, falsaðar eða þeim eytt. Ef þörf er á fyrirframleyfi frá dómsyfirvöldum hlutaðeigandi aðildarríkis, í samræmi við landslög, ætti að heimila aðgang að húsakynnum eftir að viðkomandi fyrirframleyfi dómstóla hefur fengist.

65) Skráningar og upptökur símtala og gagnaumferðarskrár frá verðbréfafyrirtækjum, lánastofnunum og fjármálastofnunum sem framkvæma og skrá framkvæmd viðskipta sem og skrár yfir símtöl og gagnaumferðarskrár frá fjarskiptafyrirtækjum skipta sköpum og eru stundum einu sönnunargögnin til að greina og sanna innherjasvik og markaðsmisnotkun. Skrár yfir símtöl og gagnaumferð geta fært sönnur á deili aðila sem ber ábyrgð á dreifingu rangra eða villandi upplýsinga eða að aðilar hafi verið í samskiptum á tilteknum tíma og að samband sé á milli tveggja eða fleiri aðila. Því ættu lögbær yfirvöld að geta krafist þess að fá skráningar og upptökur símtala, rafrænna fjarskipta og gagnaumferðarskrár sem eru í fórum verðbréfafyrirtækis, lánastofnunar eða fjármálastofnunar í samræmi við tilskipun 2014/65/ESB. Aðgangur að gögnum og skrám yfir símtöl er nauðsynlegur til að færa sönnur á og rannsaka vísbendingar um möguleg innherjasvik og markaðsmisnotkun og þar af leiðandi til að greina markaðssvik og beita viðurlögum vegna þeirra. Til að innleiða jöfn samkeppnisskilyrði í Sambandinu, að því er varðar aðgang að skrám yfir símtöl og gagnaumferð í fórum fjarskiptafyrirtækis eða skrár yfir símtöl og gagnaumferð í fórum verðbréfafyrirtækis, lánastofnunar eða fjármálastofnunar, ættu lögbær yfirvöld, í samræmi við landslög, að geta krafist þess að fá skrár yfir símtöl og gagnaumferð í fórum fjarskiptafyrirtækis, að því marki sem heimilt er samkvæmt landslögum, og skráningu og upptökur símtala og gagnaumferðarskrár í fórum verðbréfafyrirtækis, þegar rökstuddur grunur er um að slík gögn tengd efni úttektar eða rannsóknar geti skipt máli til að sanna innherjasvik eða markaðsmisnotkun sem brýtur í bága við þessa reglugerð. Aðgangur að skrám yfir símtöl og gagnaumferð í fórum fjarskiptafyrirtækis nær ekki yfir aðgang að innihaldi talfjarskipta um síma.

66) Þrátt fyrir að þessi reglugerð mæli fyrir um lágmarksvaldheimildir sem lögbær yfirvöld ættu að hafa, skal beita því valdi innan heildarkerfis landslaga sem tryggir virðingu fyrir grundvallarréttindum, þ.m.t. réttinum til friðhelgi einkalífs. Við beitingu þessara valdheimilda sem gætu haft í för með sér alvarlega skerðingu á réttinum til að virða einka- og fjölskyldulíf, heimili og samskipti ættu aðildarríkin að hafa á að skipa fullnægjandi og gagnlegum úrræðum gegn hvers konar misnotkun, t.d., þar sem við á, viðeigandi fyrirframleyfi dómsyfirvalda viðkomandi aðildarríkis. Aðildarríki ættu að gefa kost á því að lögbær yfirvöld beiti þess háttar valdi til inngripa, eftir því sem þurfa þykir, til að nauðsynleg rannsókn geti farið fram á alvarlegum tilvikum þar ekki eru til neinar sambærilegar aðferðir til að ná sömu niðurstöðu með árangursríkum hætti.

67) Þar sem markaðssvik geta átt sér stað yfir landamæri og þvert á markaði skulu lögbær yfirvöld alltaf, nema við sérstakar aðstæður, hafa samstarf og skiptast á upplýsingum við önnur lögbær yfirvöld og eftirlitsyfirvöld og við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina, einkum í tengslum við rannsóknaraðgerðir. Ef lögbært yfirvald er þess fullvisst að markaðssvik séu stunduð eða hafi átt sér stað í öðru aðildarríki eða hafi áhrif á fjármálagerninga sem viðskipti eru með í öðru aðildarríki ætti það að tilkynna lögbæra yfirvaldinu og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni um það. Ef um er að ræða markaðssvik sem hafa áhrif yfir landamæri ætti Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin að geta haft yfirumsjón með rannsókninni ef eitt lögbæru yfirvaldanna óskar eftir því.

68) Nauðsynlegt er fyrir lögbær yfirvöld að hafa þau tæki sem þarf til skilvirks eftirlits með tilboðaskrám þvert á markaði. Samkvæmt tilskipun 2014/65/ESB geta lögbær yfirvöld óskað eftir og fengið gögn frá öðrum lögbærum yfirvöldum í tengslum við tilboðaskrána til að hjálpa til við að vakta og greina markaðsmisnotkun yfir landamæri.

69) Til að tryggja upplýsingaskipti og samstarf við yfirvöld í þriðja landi í tengslum við skilvirka framfylgd þessarar reglugerðar ættu lögbær yfirvöld að gera samstarfssamninga við samsvarandi aðila í þriðju löndum. Öll sending persónuupplýsinga sem fram fer á grundvelli þessara samninga ætti að vera í samræmi við tilskipun 95/46/EB og við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 45/2001 ([1]).

70) Traustur varfærnis- og viðskiptaháttarammi fyrir fjármálageirann ætti að hvíla á traustu fyrirkomulagi eftirlits, rannsókna og viðurlaga. Í þeim tilgangi ættu eftirlitsyfirvöld að hafa nægar valdheimildir til að geta brugðist við og ættu að geta treyst á jafngilt, öflugt og fyrirbyggjandi fyrirkomulag viðurlaga við hvers konar fjármálamisferli, og framfylgja ætti viðurlögum með skilvirkum hætti. Larosière hópurinn taldi þó engan þessara þátta fyrir hendi eins og er. Í orðsendingu framkvæmdastjórnarinnar frá 8. desember 2010 um að efla fyrirkomulag viðurlaga á sviði fjármálaþjónustu hefur verið gerð endurskoðun á gildandi valdheimildum og beitingu þeirra í reynd sem miðar að því að koma á samræmdum viðurlögum á öllum sviðum eftirlitsstarfsemi.

71) Því ætti að kveða á um stjórnsýsluviðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir til að tryggja samræmda nálgun í aðildarríkjum og til að auka varnaðaráhrif þeirra. Lögbært yfirvald ætti að eiga möguleika á að banna einstaklingum að gegna stjórnunarstörfum innan verðbréfafyrirtækis. Ákvarða ætti viðurlög sem lögð eru á í sérstökum tilvikum með tilliti til viðeigandi þátta s.s. endurgreiðslu sannreynanlegs fjárhagslegs ávinnings, alvarleika og tímalengdar brotsins, allra þátta sem auka eða milda refsinæmi, þeirrar þarfar að sektir hafi varnaðaráhrif og, eftir því sem við á, ætti að veita afslátt vegna samvinnu við lögbært yfirvald. Einkum getur raunveruleg fjárhæð stjórnsýslusekta sem lagðar eru á í tilteknu tilviki náð hámarkinu sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eða hærri fjárhæð sem kveðið er á um í landslögum, vegna mjög alvarlegra brota en beita má sektum sem eru mikið lægri en hámarkið vegna minniháttar brota eða ef um er að ræða sáttagerð. Þessi reglugerð takmarkar ekki möguleika aðildarríkja á að kveða á um hærri stjórnsýsluviðurlög eða aðrar stjórnsýsluráðstafanir.

72) Þrátt fyrir að ekkert komi í veg fyrir að aðildarríki mæli fyrir um reglur um stjórnsýslu- og refsiviðurlög við sömu brotum ætti þess ekki að vera krafist að þau mæli fyrir um reglur um stjórnsýsluviðurlög við brotum gegn þessari reglugerð ef þau falla þegar undir landsbundinn refsirétt 3. júlí 2016. Aðildarríkjum er, í samræmi við landslög, ekki skylt að beita bæði stjórnsýslu- og refsiviðurlögum við sama brotinu, en þau geta gert það ef landslög þeirra heimila. En

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 45/2001 frá 18. desember 2000 um vernd einstaklinga í tengslum við vinnslu persónuupplýsinga, sem stofnanir og aðilar Bandalagsins hafa unnið, og um frjálsa miðlun slíkra upplýsinga (Stjtíð. EB L 8, 12.1.2001, bls. 1).

ef refsiviðurlögum er beitt í stað stjórnsýsluviðurlaga við brotum gegn þessari reglugerð eða tilskipun 2014/57/ESB ætti slíkt ekki að draga úr eða hafa áhrif að öðru leyti á möguleika lögbærra yfirvalda á að starfa saman, hafa aðgang að og skiptast á upplýsingum tímanlega við lögbær yfirvöld í öðrum aðildarríkjum í tengslum við þessa reglugerð, einnig eftir að viðkomandi brotum hefur verið vísað til saksóknar hjá lögbærum dómsyfirvöldum.

73) Almennt ætti að birta ákvarðanir sem lögbær yfirvöld taka til að tryggja að þær hafi letjandi áhrif á allan almenning. Birting ákvarðana er einnig mikilvægt tæki fyrir lögbær yfirvöld til að upplýsa markaðsaðila um hvaða hegðun telst vera brot á þessari reglugerð og til að stuðla að góðri hegðun meðal markaðsaðila. Ef slík birting veldur hlutaðeigandi aðilum óhóflegum skaða eða stofnar stöðugleika fjármálamarkaða eða yfirstandandi rannsókn í hættu ætti lögbært yfirvald að birta upplýsingar um stjórnsýsluviðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir nafnlaust í samræmi við landslög eða fresta birtingu. Lögbær yfirvöld ættu að eiga kost á því að birta ekki upplýsingar um viðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir ef birting án nafngreiningar eða frestun birtingar telst ekki nægileg ráðstöfun til að tryggja að stöðugleika fjármálamarkaðanna verði ekki stofnað í hættu. Þá ætti lögbærum yfirvöldum heldur ekki að vera skylt að birta upplýsingar um ráðstafanir sem teljast minniháttar og birting telst ekki í réttu hlutfalli við brotið.

74) Uppljóstrarar geta vakið athygli lögbærra yfirvalda á nýjum upplýsingum sem geta hjálpað þeim að koma upp um innherjasvik og markaðsmisnotkun og leggja á viðurlög. Ótti við hefndaraðgerðir kann hins vegar að fæla uppljóstrara frá slíku eða þá kann að skorta hvatningu til uppljóstrana. Tilkynningar um brot á þessari reglugerð eru nauðsynlegar til að tryggja að lögbært yfirvald geti greint markaðssvik og beitt viðurlögum við þeim. Ráðstafanir að því er varðar uppljóstrara eru nauðsynlegar til að stuðla að því að unnt sé að greina markaðssvik og til að tryggja verndun uppljóstrarans og að réttindi hans séu virt, sem og réttindi sakborningsins. Þessi reglugerð ætti því að tryggja að fullnægjandi fyrirkomulag sé fyrir hendi til að gera uppljóstrurum kleift að gera lögbærum yfirvöldum viðvart um möguleg brot gegn þessari reglugerð og vernda þá fyrir refsiaðgerðum. Aðildarríkjum ætti að vera heimilt að kveða á um fjárhagslega hvata fyrir þá aðila sem veita viðeigandi upplýsingar um möguleg brot gegn þessari reglugerð. Hinsvegar ættu uppljóstrarar einungis að eiga rétt á slíkum fjárhagslegum hvata ef þeir leiða nýjar upplýsingar í ljós sem þeim ber ekki þegar lagaleg skylda til að tilkynna og ef upplýsingarnar leiða til viðurlaga vegna brota gegn þessari reglugerð. Aðildarríki ættu einnig að tryggja að í uppljóstrarakerfum, sem þau koma á, sé tilhögun sem veitir sakborningi viðeigandi vernd, einkum að því er varðar réttinn til verndar persónuupplýsingum hans og málsmeðferð til að tryggja rétt hans til að taka til varna og flytja mál sitt áður en ákvörðun er hann varðar er tekin, auk réttarins til raunhæfs úrræðis til að leita réttar síns fyrir dómstóli vegna ákvörðunar sem varðar hann.

75) Þar eð aðildarríki hafa samþykkt löggjöf til framkvæmdar tilskipun 2003/6/EB og þar eð samþykkja ætti þær framseldu gerðir, tæknilegu eftirlitsstaðla og tæknilegu framkvæmdarstaðla, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, áður en unnt er að beita rammanum, sem stefnt er að því að innleiða, með nytsamlegum hætti er nauðsynlegt að fresta beitingu efnisákvæða þessarar reglugerðar í nægilega langan tíma.

76) Til að auðvelda snurðulausa gildistöku þessarar reglugerðar getur markaðsframkvæmd, sem var í gildi fyrir gildistöku þessarar reglugerðar og lögbær yfirvöld hafa samþykkt í samræmi við tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2004/72/EB ([1]) að því er varðar beitingu a-liðar 2. liðar 1. gr. tilskipunar 2003/6/EB, áfram gilt að því tilskildu að tilkynnt sé um hana til Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar innan tilskilins tíma, þar til lögbært yfirvald hefur tekið ákvörðun um hvort þessari framkvæmd skuli haldið áfram í samræmi við þessa reglugerð.

77) Í þessari reglugerð eru grundvallarréttindi virt og þeim meginreglum fylgt sem viðurkenndar eru í sáttmála Evrópusambandsins um grundvallarréttindi (sáttmáli). Þar af leiðandi ber að túlka og beita þessari reglugerð í samræmi við þau réttindi og meginreglur. Þegar þessi reglugerð vísar til reglna um fjölmiðlafrelsi og tjáningarfrelsi í öðrum miðlum og reglna eða venja sem gilda um blaða- og fréttamennsku ætti einkum að taka tillit til þess frelsis sem tryggt er í Sambandinu og í aðildarríkjunum og viðurkennt er skv. 11. gr. sáttmálans og öðrum viðeigandi ákvæðum.

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2273/2003 frá 22. desember 2003 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB að því er varðar undanþágur fyrir endurkaupaáætlanir og verðjöfnun fjármálagerninga (Stjtíð. ESB L 336, 23.12.2003, bls. 33).

78) Til að auka gagnsæi og til að upplýsa betur um fyrirkomulag viðurlaga ættu lögbær yfirvöld að leggja árlega fram nafnlaus og samantekin gögn hjá Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni. Þessi gögn ættu að fela í sér fjölda rannsókna sem hafist hafa, fjölda yfirstandandi rannsókna og fjölda þeirra sem lauk á viðkomandi tímabili.

79) Tilskipun 95/46/EB og reglugerð (EB) nr. 45/2001 gilda um vinnslu Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar á persónuupplýsingum innan ramma þessarar reglugerðar og undir eftirliti lögbærra yfirvalda í aðildarríkjunum, einkum þeirra opinberu óháðu yfirvalda sem aðildarríkin tilnefna. Öll upplýsingaskipti eða sending upplýsinga af hálfu lögbærra yfirvalda ætti að vera í samræmi við reglur um miðlun persónuupplýsinga eins og mælt er fyrir um í tilskipun 95/46/EB. Öll upplýsingaskipti eða sending upplýsinga sem framkvæmd er af Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni ætti að vera í samræmi við reglurnar um miðlun persónuupplýsinga eins og mælt er fyrir um í reglugerð (EB) nr. 45/2001.

80) Þessi reglugerð, auk framseldra gerða, framkvæmdargerða, tæknilegra eftirlitsstaðla, tæknilegra framkvæmdarstaðla og viðmiðunarreglna sem samþykktar eru í samræmi við þær, hafa ekki áhrif á beitingu samkeppnisreglna Sambandsins.

81) Til að tilgreina kröfurnar í þessari reglugerð ætti að fela framkvæmdastjórninni vald til að samþykkja gerðir, í samræmi við 290. gr. sáttmálans um Evrópusambandið, að því er varðar undanþágu tiltekinna opinberra aðila og seðlabanka þriðju landa og tiltekinna tilnefndra opinberra aðila í þriðju löndum, sem hafa gert tengslasamning við Sambandið í skilningi 25. gr. tilskipunar 2003/87/EB, frá gildissviði þessarar reglugerðar; vísbendingar um misnotkun sem taldar eru upp í I. viðauka við þessa reglugerð; viðmiðunarmörk vegna ákvörðunar á beitingu skyldu til opinberrar birtingar upplýsinga fyrir þátttakendur á markaði með losunarheimildir; við hvaða aðstæður heimilt er að eiga viðskipti á lokuðu tímabili; og þær gerðir tiltekinna viðskipta, sem framkvæmd eru af einstaklingum sem gegna stjórnunarstörfum eða einstaklingum nákomnum þeim, sem myndu hrinda af stað kröfu um tilkynningu. Einkar mikilvægt er að framkvæmdastjórnin hafi viðeigandi samráð meðan á undirbúningsvinnu hennar stendur, þ.m.t. við sérfræðinga. Við undirbúning og samningu framseldra gerða ætti framkvæmdastjórnin að tryggja samhliða, tímanlega og viðeigandi afhendingu viðkomandi skjala til Evrópuþingsins og ráðsins.

82) Til að tryggja samræmd skilyrði fyrir framkvæmd þessarar reglugerðar að því er varðar verklag fyrir tilkynningar á brotum gegn þessari reglugerð ætti að fela framkvæmdastjórninni framkvæmdarvald til að tilgreina þetta verklag, þ.m.t. fyrirkomulag um eftirfylgni tilkynninga og ráðstafanir til verndar einstaklingum sem starfa samkvæmt ráðningarsamningi og ráðstafanir um vernd persónuupplýsinga. Þessu valdi ætti að beita í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 182/2011 ([1]).

83) Tæknilegir staðlar í fjármálaþjónustu ættu að tryggja samræmd skilyrði alls staðar í Sambandinu að því er varðar þau málefni sem þessi reglugerð tekur til. Þar eð Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin býr yfir mikilli sérhæfðri sérþekkingu væri það skilvirkt og viðeigandi að fela stofnuninni að semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum og tæknilegum framkvæmdarstöðlum, sem fela ekki í sér ákvarðanir um stefnu, til að leggja fyrir framkvæmdastjórnina.

84) Fela ætti framkvæmdastjórninni vald til að samþykkja drögin að tæknilegu eftirlitsstöðlunum sem Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin hefur samið, tilgreina efni tilkynninga sem rekstraraðilar skipulegra verðbréfa-markaða, markaðstorga fjármálagerninga eða skipulegra markaðstorga skulu senda um fjármálagerninga sem teknir hafa verið til viðskipta, sem viðskipti eru með eða sem óskað hefur verið eftir að verði teknir til viðskipta á viðskiptavettvangi þeirra; með hvaða hætti og skilyrðum Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal taka saman, birta og viðhalda listanum yfir þessa gerninga; skilyrðin sem endurkaupaáætlanir og ráðstafanir til verðjöfnunar skulu uppfylla, þ.m.t. skilyrði um takmörkun á viðskiptum, tíma og magni, birtingar- og tilkynningarskyldu og verðskilyrði verðjöfnunar; í tengslum við verklag og fyrirkomulag, kerfi fyrir viðskiptavettvanga til að koma í veg fyrir og greina markaðssvik og kerfi og sniðmát sem einstaklingar geta notað til að greina og tilkynna um grunsamleg fyrirmæli og

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 182/2011 frá 16. febrúar 2011 um reglur og almennar meginreglur varðandi tilhögun eftirlits aðildarríkjanna með framkvæmdastjórninni þegar hún beitir framkvæmdarvaldi sínu (Stjtíð. ESB L 55, 28.2.2011, bls. 13).

viðskipti; viðeigandi fyrirkomulag, verklag og kröfur um skráningu við markaðsþreifingar; og að því er varðar tæknilegt fyrirkomulag fyrir flokka aðila til að setja fram á óhlutdrægan hátt ráðleggingar um fjárfestingaráætlun og veita upplýsingar um tiltekna hagsmuni eða tilgreina hagsmunaárekstra með framseldum gerðum skv. 290. gr. sáttmálans um Evrópusambandið og í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1093/2010 ([1]). Einkum er mikilvægt að framkvæmdastjórnin hafi viðeigandi samráð meðan á undirbúningsvinnu hennar stendur, þ.m.t. við sérfræðinga.

85) Framkvæmdastjórnin skal einnig hafa vald til að samþykkja tæknilega framkvæmdarstaðla með framkvæmdargerðum skv. 291. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins og í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1093/2010. Fela ætti Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni að semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að leggja fyrir framkvæmdastjórnina varðandi opinbera birtingu innherjaupplýsinga, snið innherjalista og snið og verklag samstarfs og upplýsingaskipta lögbærra yfirvalda sín á milli og við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina.

86) Þar eð aðildarríkin geta ekki fyllilega náð markmiði þessarar reglugerðar, þ.e. að koma í veg fyrir markaðssvik í formi innherjasvika, ólögmætrar miðlunar innherjaupplýsinga og markaðsmisnotkunar, og þar eð því verður betur náð á vettvangi Sambandsins vegna umfangs þess og áhrifa, er Sambandinu heimilt að samþykkja ráðstafanir í samræmi við nálægðarregluna eins og kveðið er á um í 5. gr. sáttmálans um Evrópusambandið. Í samræmi við meðalhófsregluna, eins og hún er sett fram í þeirri grein, er ekki gengið lengra en nauðsyn krefur í þessari reglugerð til að ná þessu markmiði.

87) Þar sem ákvæði tilskipunar 2003/6/EB eiga ekki lengur við og eru ófullnægjandi ætti að fella þá tilskipun úr gildi frá 3. júlí 2016. Kröfurnar og bönnin í þessari reglugerð eru eingöngu tengd ákvæðum tilskipunar 2014/64/ESB og ættu því að taka gildi á gildistökudegi þeirrar tilskipunar.

88) Til að hægt sé að beita þessari reglugerð á réttan hátt er nauðsynlegt að aðildarríki geri allar viðeigandi ráðstafanir til að tryggja að landslög þeirra uppfylli, fyrir 3. júlí 2016, ákvæði þessarar reglugerðar er varða lögbær yfirvöld og valdheimildir þeirra, stjórnsýsluviðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir, tilkynningar um brot og birtingu ákvarðana.

89) Evrópska persónuverndarstofnunin skilaði áliti 10. febrúar 2012 ([2]).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. KAFLI

ALMENN ÁKVÆÐI

1. gr.

Efni

Með reglugerð þessari er settur sameiginlegur reglurammi um innherjasvik, ólögmæta miðlun innherjaupplýsinga og markaðsmisnotkun (markaðssvik) og ráðstafanir til að koma í veg fyrir markaðssvik í því skyni að tryggja heilleika fjármálamarkaða í Sambandinu og efla fjárfestavernd og tiltrú á þessum mörkuðum.

2. gr.

Gildissvið

1. Reglugerð þessi gildir um eftirfarandi:

a) fjármálagerninga sem teknir hafa verið til viðskipta á skipulegum markaði eða óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta á skipulegum markaði,

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1093/2010 frá 24. nóvember 2010 um að koma á fót evrópskri eftirlitsstofnun (Evrópska bankaeftirlitsstofnunin), um breytingu á ákvörðun nr. 716/2009/EB og niðurfellingu ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 2009/78/EB (Stjtíð. ESB L 331, 15.12.2010, bls. 12).

([2]) Stjtíð. ESB C 177, 20.6.2012, bls. 1.

b) fjármálagerninga sem viðskipti eru með á markaðstorgi fjármálagerninga, teknir hafa verið til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga eða óskað hefur verið eftir að teknir verði til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga,

c) fjármálagerninga sem viðskipti eru með á skipulegu markaðstorgi,

d) fjármálagerninga sem falla ekki undir a-, b- eða c-lið en svo er háttað að verð eða virði þeirra er háð eða hefur áhrif á verð eða virði fjármálagernings sem um getur í þessum liðum, þ.m.t., en ekki takmarkað við, skuldatryggingar og mismunasamninga.

Þessi reglugerð gildir einnig um hegðun eða viðskipti, þ.m.t. kauptilboð, í tengslum við uppboð á uppboðsvettvangi sem hefur starfsleyfi sem skipulegur markaður með losunarheimildir eða aðrar uppboðsvörur sem grundvallast á þeim, þ.m.t. þegar uppboðsvörurnar eru ekki fjármálagerningar, samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010. Án þess að hafa áhrif á sértæk ákvæði sem vísa til kauptilboða sem lögð eru fram í tengslum við uppboð skulu allar kröfur og bönn í þessari reglugerð sem varða viðskiptafyrirmæli gilda um slík kauptilboð.

2. Ákvæði 12. og 15. gr. gilda einnig um:

a) stundarsamninga um hrávörur sem eru ekki heildsöluorkuafurðir, ef viðskiptin, fyrirmælin eða hegðunin hefur, eða er líkleg til eða henni er ætlað að hafa, áhrif á verð eða virði fjármálagernings sem um getur í 1. mgr.,

b) tegundir fjármálagerninga, þ.m.t. afleiðusamninga eða afleiðugerninga til yfirfærslu á greiðslufallsáhættu, ef viðskiptin, fyrirmælin, kauptilboðið eða hegðunin hefur, eða er líkleg til að hafa, áhrif á verð eða virði stundarsamnings um hrávörur ef verðið eða virðið er háð verði eða virði þessara fjármálagerninga, og

c) hegðun í tengslum við viðmiðunargildi.

3. Reglugerð þessi gildir um öll viðskipti, fyrirmæli og hegðun sem varða hvers kyns fjármálagerninga sem um getur í 1. og 2. mgr., án tillits til þess hvort slík viðskipti eiga sér stað, fyrirmæli eru gefin eða hegðun á sér stað á viðskiptavettvangi.

4. Bönn og kröfur sem kveðið er á um í þessari reglugerð skulu gilda um athafnir og athafnaleysi, í Sambandinu og í þriðja landi, í tengslum við þá gerninga sem um getur í 1. og 2. mgr.

3. gr.

Skilgreiningar

1. Í þessari reglugerð er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

1) „fjármálagerningur“: fjármálagerningur eins og hann er skilgreindur í 15. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

2) „verðbréfafyrirtæki“: verðbréfafyrirtæki eins og það er skilgreint í 1. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

3) „lánastofnun“: lánastofnun eins og hún er skilgreind í 1. lið 1. mgr. 4. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 575/2013 ([1]),

4) „fjármálastofnun“: fjármálastofnun eins og hún er skilgreind í 26. lið 1. mgr. 4. gr. reglugerðar (ESB) nr. 575/2013,

5) „rekstraraðili markaðar“: rekstraraðili markaðar eins og hann er skilgreindur í 18. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

6) „skipulegur markaður“: skipulegur markaður eins og hann er skilgreindur í 21. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 575/2013 frá 26. júní 2013 um varfærniskröfur að því er varðar lánastofnanir og verðbréfafyrirtæki og um breytingu á reglugerð (ESB) nr. 648/2012 (Stjtíð. ESB L 176, 27.6.2013, bls. 1).

7) „markaðstorg fjármálagerninga“ eða „MTF“: marghliða kerfi eins og skilgreint er í 22. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

8) „skipulegt markaðstorg“ eða „OTF“: kerfi eða torg í Sambandinu eins og skilgreint er í 23. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

9) „viðurkennd markaðsframkvæmd“: tiltekin markaðsframkvæmd sem viðurkennd er af lögbæru yfirvaldi í samræmi við 13. gr.,

10) „viðskiptavettvangur“: viðskiptavettvangur eins og hann er skilgreindur í 24. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

11) „vaxtarmarkaður lítilla og meðalstórra fyrirtækja“: vaxtarmarkaður fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki eins og hann er skilgreindur í 12. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

12) „lögbært yfirvald“: yfirvald sem tilgreint er í samræmi við 22. gr., nema annað sé tekið fram í þessari reglugerð,

13) „aðili“: einstaklingur eða lögaðili,

14) „hrávara“: hrávara eins og hún er skilgreind í 1. lið 2. gr. reglugerðar framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1287/2006 ([1]),

15) „stundarsamningur um hrávöru“: samningur um afhendingu á hrávöru sem viðskipti eru með á stundarmarkaði, sem er afhent án tafar við uppgjör viðskiptanna, og samningur um afhendingu hrávöru sem er ekki fjármálagerningur, þ.m.t. framvirkur samningur sem er gerður upp efnislega,

16) „stundarmarkaður“: hrávörumarkaður þar sem hrávörur eru seldar gegn peningum og afhentar án tafar við uppgjör viðskiptanna, og aðrir markaðir sem ekki eru fjármálamarkaðir, s.s. framvirkir markaðir með hrávörur,

17) „endurkaupaáætlun“: viðskipti með eigin hlutabréf í samræmi við 21.–27. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2012/30/ESB ([2]),

18) „algrímsviðskipti“: algrímsviðskipti eins og þau eru skilgreind í 39. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

19) „losunarheimild“: losunarheimild eins og lýst er í 11. lið C-þáttar I. viðauka við tilskipun 2014/65/ESB,

20) „þátttakandi á markaði með losunarheimildir“: aðili sem á í viðskiptum, þ.m.t. að gefa fyrirmæli um viðskipti, með losunarheimildir, uppboðsvörur sem grundvallast á þeim eða afleiður þeirra, og nýtur ekki undanþágu skv. annarri undirgrein 2. mgr. 17. gr.,

21) „útgefandi“: lögaðili sem heyrir undir opinberan rétt eða einkarétt og gefur út eða hefur í hyggju að gefa út fjármálagerninga, en sé um að ræða heimildarskírteini sem standa fyrir fjármálagerninga, er átt við útgefanda þeirra fjármálagerninga sem þau standa fyrir,

22) „heildsöluorkuafurð“: heildsöluorkuafurð eins og hún er skilgreind í 4. lið 2. gr. reglugerðar (EB) nr. 1227/2011,

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1287/2006 frá 10. ágúst 2006 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/39/EB að því er varðar skyldur verðbréfafyrirtækja varðandi skýrsluhald, tilkynningar um viðskipti, gagnsæi á markaði, skráningu fjármálagerninga á markað og skilgreind hugtök í skilningi þeirrar tilskipunar (Stjtíð. ESB L 241, 2.9.2006, bls. 1).

([2]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2012/30/ESB frá 25. október 2012 um samræmingu verndarráðstafana, sem ætlað er að vera jafngildar í Bandalaginu og aðildarríki krefjast þegar almenningshlutafélög eru stofnuð og um tilskilið hlutafé og heimilaðar breytingar á hlutafé þeirra í skilningi annarrar málsgreinar 54. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins til að vernda hagsmuni félagsmanna og annarra (Stjtíð. ESB L 315, 14.11.2012, bls. 74).

23) „landsbundið eftirlitsyfirvald“: landsbundið eftirlitsyfirvald eins og það skilgreint í 10. lið 2. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1227/2011,

24) „hrávöruafleiða“: hrávöruafleiða eins og hún er skilgreind í 30. lið 1. mgr. 2. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 600/2014 ([1]),

25) „einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum“: einstaklingur innan útgefanda, þátttakanda á markaði með losunarheimildir eða annars aðila sem um getur í 10. mgr. 19. gr. sem:

a) situr í stjórn, framkvæmdastjórn eða eftirlitseiningu þess aðila eða

b) er yfirstjórnandi, sem situr ekki í stjórn eða þeim einingum sem um getur í a-lið en hefur reglulegan aðgang að innherjaupplýsingum sem tengjast þeim aðila beint eða óbeint og hefur vald til að taka stjórnunarákvarðanir sem hafa áhrif á framtíðarþróun og rekstrarhorfur þess aðila,

26) „nákominn aðili“:

a) maki eða samvistarmaki sem telst jafngildur maka í samræmi við landslög,

b) barn á framfæri, í samræmi við landslög,

c) skyldmenni sem hefur búið á sama heimili í a.m.k. eitt ár á þeim degi sem viðkomandi viðskipti fara fram eða

d) lögaðili, sjóður eða sameignarfélag þar sem stjórnunarstörfum er gegnt af einstaklingi sem gegnir stjórnunarstörfum eða einstaklingi sem um getur í a-, b- eða c-lið, eða sem sá einstaklingur stjórnar beint eða óbeint, eða komið er á fót í þágu þess einstaklings eða hefur fjárhagslega hagsmuni sem fara að verulegu leyti saman við hagsmuni þess einstaklings,

27) „gagnaumferðarskrár“: skrár um umferðargögn eins og þau eru skilgreind í b-lið annarrar málsgreinar 2. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2002/58/EB ([2]),

28) „aðili sem sér um eða framkvæmir viðskipti í atvinnuskyni“: aðili sem starfar við viðtöku og sendingu fyrirmæla um, eða framkvæmd viðskipta með, fjármálagerninga,

29) „viðmiðunargildi“: gengi, vísitala eða tala sem er gerð aðgengileg almenningi eða birt og ákvörðuð öðru hverju eða reglulega með því að beita formúlu á, eða á grundvelli, verðgildis einnar eða fleiri undirliggjandi eigna eða verða, þ.m.t. áætlaðra verða, raunverulegra eða áætlaðra vaxta eða annarra gilda, eða athugana, og sem liggur til grundvallar ákvörðun fjárhæðar til greiðslu samkvæmt fjármálagerningi eða ákvörðun á virði fjármálagernings,

30) „viðskiptavaki“: viðskiptavaki eins og hann er skilgreindur í 7. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

31) „uppbygging eignarhlutar“: kaup á verðbréfum í félagi sem leiðir ekki til skyldu samkvæmt lögum eða reglum til að tilkynna um yfirtökutilboð í það félag,

32) „markaðsaðili sem miðlar upplýsingum“: aðili sem fellur í einn þeirra flokka sem settir eru fram í a- til d-lið 1. mgr. 11. gr. eða 2. mgr. 11. gr. og miðlar upplýsingum við markaðsþreifingu (e. *market sounding*),

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 600/2014 frá 15. maí 2014 um markaði fyrir fjármálagerninga og um breytingu á reglugerð ráðsins (ESB) nr. 648/2012 (Stjtíð. ESB L 173, 12.6.2014, bls. 84).

([2]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/58/EB frá 12. júlí 2002 um vinnslu persónuupplýsinga og um verndun einkalífs á sviði rafrænna fjarskipta (tilskipun um friðhelgi einkalífsins og rafræn fjarskipti) (Stjtíð. EB L 201, 31.7.2002, bls. 37).

33) „hátíðniviðskipti“: beiting hátíðniviðskiptatækni með notkun algríms eins og hún er skilgreind í 40. lið 1. mgr. 4. gr. tilskipunar 2014/65/ESB,

34) „upplýsingar sem fela í sér ráðleggingu eða tillögu um fjárfestingaráætlun“: upplýsingar:

i. sem beint eða óbeint fela í sér tiltekna tillögu um fjárfestingu í tengslum við fjármálagerning eða útgefanda og sem óháður sérfræðingur, verðbréfafyrirtæki, lánastofnun eða annar aðili sem hefur það að aðalstarfsemi að veita ráðleggingar um fjárfestingar, eða einstaklingur sem starfar hjá slíkum aðila samkvæmt ráðningarsamningi eða á annan hátt, leggur fram eða

ii. sem aðrir en þeir aðilar, sem um getur í i. lið, veita og fela í sér beina tillögu um tiltekna fjárfestingarákvörðun í tengslum við fjármálagerning,

35) „fjárfestingarráðleggingar“: upplýsingar sem með beinum eða óbeinum hætti fela í sér ráðleggingu eða tillögu um fjárfestingaráætlun í tengslum við einn eða fleiri fjármálagerninga eða útgefendur, þ.m.t. álit á núverandi virði eða verði eða framtíðarvirði eða -verði slíkra gerninga, sem ætlunin er að fari um dreifileiðir eða ætluð er almenningi.

2. Að því er varðar 5. gr. er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

a) „verðbréf“:

i. hlutabréf og önnur verðbréf sem eru jafngild hlutabréfum,

ii. skuldabréf og önnur form verðbréfaðra skulda eða

iii. verðbréfaðar skuldir sem eru breytanlegar eða skiptanlegar í hlutabréf eða önnur verðbréf sem eru jafngild hlutabréfum,

b) „tengdir gerningar“: eftirfarandi gerningar, þ.m.t. þeir sem eru ekki teknir til viðskipta eða ekki eru viðskipti með á viðskiptavettvangi, eða sem ekki hefur verið óskað eftir að verði teknir til viðskipta á viðskiptavettvangi:

i. samningar eða réttur til að skrá sig fyrir, kaupa eða selja verðbréf,

ii. fjármálaafleiður verðbréfa,

iii. séu verðbréfin breytanlegir eða skiptanlegir skuldagerningar, verðbréfin sem unnt er að breyta eða skipta slíkum breytanlegum eða skiptanlegum skuldagerningum í,

iv. gerningar sem útgefandi eða ábyrgðaraðili verðbréfanna gefur út eða ábyrgist þar sem líklegt er að markaðsverð þeirra hafi veruleg áhrif á verð verðbréfanna eða öfugt,

v. séu verðbréfin jafngild hlutabréfum, hlutabréfin sem þessi verðbréf standa fyrir og önnur verðbréf sem eru jafngild þeim hlutabréfum,

c) „sala á verulegum eignarhlut“: frumútboð verðbréfa eða útboð verðbréfa á eftirmarkaði sem er aðgreint frá venjulegum viðskiptum, bæði að því er varðar virði verðbréfanna sem boðin eru út og söluaðferðina sem er notuð,

d) „verðjöfnun“: kaup eða kauptilboð á verðbréfum, eða viðskipti með tengda gerninga sem jafngilda þeim, af hendi lánastofnunar eða verðbréfafyrirtækis í tengslum við sölu á verulegum eignarhlut í verðbréfunum eingöngu til að styðja við markaðsverð verðbréfanna í fyrirframákveðinn tíma, vegna söluþrýstings á þau verðbréf.

4. gr.

Tilkynningar og listi yfir fjármálagerninga

1. Rekstraraðilar skipulegra markaða og verðbréfafyrirtæki og rekstraraðilar markaða sem reka markaðstorg fjármálagerninga eða skipulegt markaðstorg skulu, án tafar, tilkynna lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins um alla fjármálagerninga sem óskað er eftir að séu teknir til viðskipta á viðskiptavettvangi þeirra, eða sem teknir eru til viðskipta eða viðskipti eru með í fyrsta sinn.

Þeir skulu einnig tilkynna lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins um það þegar viðskiptum með fjármálagerning er hætt eða hætt er að taka hann til viðskipta, nema dagsetningin þegar viðskiptum með fjármálagerninginn er hætt eða þegar hætt er að taka hann til viðskipta sé þekkt og vísað hafi verið til hennar í tilkynningu sem var send í samræmi við fyrstu undirgrein.

Tilkynningar sem um getur í þessari málsgrein skulu tilgreina, eftir því sem við á, heiti og auðkenni viðkomandi fjármálagernings og dagsetningu og tíma beiðninnar um töku til viðskipta, dagsetningu og tíma töku til viðskipta og dagsetningu og tíma fyrstu viðskipta.

Rekstraraðilar markaða og verðbréfafyrirtæki skulu einnig senda lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins þær upplýsingar sem tilgreindar eru í þriðju undirgrein að því er varðar fjármálagerninga sem óskað var eftir að teknir yrðu til viðskipta eða sem teknir voru til viðskipta fyrir 2. júlí 2014 og sem enn eru teknir til viðskipta eða viðskipti eru með á þeim degi.

2. Lögbær yfirvöld viðskiptavettvangsins skulu án tafar senda áfram tilkynningar sem þeim berast skv. 1. mgr. til Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal birta slíkar tilkynningar á vefsetri sínu í formi lista án tafar við móttöku. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal uppfæra listann án tafar við móttöku tilkynningar lögbærs yfirvalds viðskiptavettvangs. Listinn takmarkar ekki gildissvið þessarar reglugerðar.

3. Á listanum skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram:

a) heiti og auðkenni fjármálagerninga sem óskað er eftir að teknir séu til viðskipta, sem teknir eru til viðskipta eða sem viðskipti eru með í fyrsta sinn, á skipulegum mörkuðum, markaðstorgum fjármálagerninga og skipulegum markaðstorgum,

b) dagsetningar og tími beiðna um töku til viðskipta, dagsetningar og tími töku til viðskipta eða dagsetningar og tími fyrstu viðskipta,

c) upplýsingar um þá viðskiptavettvanga þar sem óskað er eftir töku fjármálagerninga til viðskipta, þar sem þeir eru teknir til viðskipta eða þar sem viðskipti eru með þá í fyrsta sinn og

d) dagsetning og tími þegar viðskiptum er hætt með fjármálagerningana eða hætt er að taka þá til viðskipta.

4. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum til að mæla fyrir um:

a) efni þeirra tilkynninga sem um getur í 1. mgr. og

b) hvernig og með hvaða skilyrðum samantekt, birting og viðhald listans sem um getur í 3. mgr. fer fram.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1095/2010 ([1]).

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 1095/2010 frá 24. nóvember 2010 um að koma á fót evrópskri eftirlitsstofnun (Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin), um breytingu á ákvörðun nr. 716/2009/EB og um niðurfellingu á ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2009/77/EB (Stjtíð. ESB L 331, 15.12.2010, bls. 84).

5. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar á þessari grein skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að mæla fyrir um tímasetningu, form og snið framlagningar á tilkynningum skv. 1. og 2. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

5. gr.

Undanþágur vegna endurkaupaáætlana og verðjöfnunar

1. Þau bönn sem getið er um í 14. og 15. gr. þessarar reglugerðar gilda ekki um viðskipti með eigin hlutabréf sem hluta af endurkaupaáætlunum þar sem:

a) tæmandi upplýsingar um áætlunina eru birtar áður en viðskipti hefjast,

b) viðskipti eru tilkynnt sem hluti endurkaupaáætlunarinnar til lögbærs yfirvalds viðskiptavettvangsins í samræmi við 3. mgr. og í kjölfarið tilkynnt opinberlega,

c) farið er eftir fullnægjandi verð- og magntakmörkunum og

d) þau eru framkvæmd í samræmi við þau markmið sem um getur í 2. mgr. og þau skilyrði sem tilgreind eru í þessari grein og í þeim tæknilegu eftirlitsstöðlum sem um getur í 6. mgr.

2. Til að njóta undanþágunnar sem kveðið er á um í 1. mgr. skal eini tilgangur endurkaupaáætlunarinnar vera:

a) að lækka hlutafé útgefanda,

b) að standa við skuldbindingar sem leiða af skuldagerningum sem eru skiptanlegir í eiginfjárgerninga eða

c) að standa við skuldbindingar sem leiða af kaupréttaráætlunum eða öðrum úthlutunum hlutabréfa til handa starfsmönnum, stjórnarmönnum, þeim sem starfa í framkvæmdastjórn eða eftirlitseiningum útgefandans eða hlutdeildarfélags.

3. Til að njóta undanþágunnar sem kveðið er á um í 1. mgr. skal útgefandinn tilkynna lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins, þar sem hlutabréfin hafa verið tekin til viðskipta eða viðskipti eru með þau, um öll viðskipti í tengslum við endurkaupaáætlunina, þ.m.t. þær upplýsingar sem tilgreindar eru í 1. og 2. mgr. 25. gr. og 1., 2. og 3. mgr. 26. gr. reglugerðar (ESB) nr. 600/2014.

4. Þau bönn sem getið er um í 14. og 15. gr. þessarar reglugerðar gilda ekki um viðskipti með verðbréf eða tengda gerninga til verðjöfnunar verðbréfa þar sem:

a) verðjöfnun fer fram í takmarkaðan tíma,

b) viðeigandi upplýsingar um verðjöfnunina eru birtar og tilkynntar lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins í samræmi við 5. mgr.,

c) farið er eftir fullnægjandi verðtakmörkunum og

d) viðskiptin uppfylla þau skilyrði um verðjöfnun sem mælt er fyrir um í tæknilegu eftirlitsstöðlunum sem um getur í 6. mgr.

5. Án þess að hafa áhrif á 1. mgr. 23. gr. skulu útgefendur, tilboðsgjafar eða aðilar sem taka að sér verðjöfnun, hvort heldur er fyrir hönd fyrrnefndra aðila eða ekki, veita lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins allar upplýsingar um öll verðjöfnunarviðskipti eigi síðar en við lok sjöundu daglegu markaðslotu eftir að slík viðskipti fara fram.

6. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum til að tilgreina þau skilyrði sem endurkaupaáætlanir og ráðstafanir til verðjöfnunar sem um getur í 1. og 4. mgr. skulu uppfylla, þ.m.t. skilyrði fyrir viðskiptum, tíma- og magntakmarkanir, birtingar- og tilkynningaskyldu og verðskilyrði.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

6. gr.

Undanþága vegna starfsemi á sviði peningastefnu og stýringar á opinberum skuldum og starfsemi sem varðar loftslagsstefnu

1. Reglugerð þessi gildir ekki um viðskipti, fyrirmæli eða hegðun eftirfarandi aðila í þeim tilgangi að fylgja peningamálastefnu, gengisstefnu eða stefnu um stýringu á opinberum skuldum:

a) aðildarríkis,

b) aðila seðlabankakerfis Evrópu,

c) ráðuneytis, stofnunar eða félags með sérstakan tilgang í einu eða fleiri aðildarríkjum eða aðila sem kemur fram fyrir hönd hinna fyrrgreindu,

d) sé um að ræða aðildarríki sem er sambandsríki, aðila sambandsríkisins.

2. Reglugerð þessi gildir ekki um viðskipti, fyrirmæli eða hegðun af hendi framkvæmdastjórnarinnar eða annarra opinberlega tilnefndrar stofnunar eða aðila sem kemur fram fyrir hennar hönd, til framfylgdar stefnu um stýringu opinberra skulda.

Reglugerð þessi gildir ekki um slík viðskipti, fyrirmæli eða hegðun af hendi:

a) Sambandsins,

b) félags með sérstakan tilgang í einu fleiri aðildarríkjum,

c) Fjárfestingarbanka Evrópu,

d) Evrópska fjármálastöðugleikasjóðsins,

e) Evrópska stöðugleikakerfisins,

f) alþjóðlegrar fjármálastofnunar sem tvö eða fleiri aðildarríki hafa komið á fót og hefur þann tilgang að vinna að fjármögnun og veita fjárhagsaðstoð til handa þeim aðilum sínum sem eiga í alvarlegum fjármögnunarerfiðleikum eða slíkir erfiðleikar steðja að.

3. Þessi reglugerð gildir ekki um starfsemi aðildarríkis, framkvæmdastjórnarinnar eða annars opinberlega tilnefnds aðila, eða aðila sem kemur fram fyrir hönd hinna fyrrgreindu, sem varðar losunarheimildir og er stunduð til að framfylgja loftslagsstefnu Sambandsins í samræmi við tilskipun 2003/87/EB.

4. Þessi reglugerð gildir ekki um starfsemi aðildarríkis, framkvæmdastjórnarinnar eða annars opinberlega tilnefnds aðila, eða aðila sem kemur fram fyrir hönd hinna fyrrgreindu, sem er stunduð til að framfylgja sameiginlegri landbúnaðarstefnu Sambandsins eða sameiginlegri sjávarútvegsstefnu Sambandsins í samræmi við gerðir sem eru samþykktar eða alþjóða-samninga sem eru gerðir samkvæmt sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins.

5. Framkvæmdastjórninni skal einnig falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. til að rýmka þá undanþágu sem um getur í 1. mgr. til að hún gildi um tiltekna opinbera aðila og seðlabanka þriðju landa.

Í því skyni skal framkvæmdastjórnin eigi síðar en 3. janúar 2016 gera og leggja fram skýrslu til Evrópuþingsins og ráðsins sem hefur að geyma mat á alþjóðlegri meðferð opinberra aðila sem falin er, eða hafa afskipti af, stýringu opinberra skulda og mat á alþjóðlegri meðferð seðlabanka þriðju landa.

Skýrslan skal hafa að geyma samanburðargreiningu á meðferð þessara aðila og seðlabanka innan lagaramma þriðju landa og skal hafa að geyma þau viðmið um áhættustýringu sem eiga við um þau viðskipti sem þessir aðilar og seðlabankar eiga í í viðkomandi lögsögum. Sé komist að þeirri niðurstöðu í skýrslunni, einkum að því er varðar samanburðargreininguna, að nauðsynlegt sé að undanskilja peningastefnulegar skyldur þessara seðlabanka þriðju landa frá skyldum og bönnum samkvæmt þessari reglugerð skal framkvæmdastjórnin rýmka undanþáguna sem um getur í 1. mgr. svo hún nái einnig til seðlabanka þeirra þriðju landa.

6. Framkvæmdastjórninni skal einnig falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. til að rýmka undanþáguna sem um getur í 3. mgr. svo að hún nái til tilnefndra opinberra aðila þriðju landa sem hafa gert samning við Sambandið skv. 25. gr. tilskipunar 2003/87/EB.

7. Þessi grein gildir ekki um aðila sem starfa samkvæmt ráðningarsamningi eða með öðrum hætti fyrir þær stofnanir sem um getur í þessari grein, ef þeir framkvæma viðskipti eða fyrirmæli, eða aðhafast, beint eða óbeint, fyrir eigin reikning stofnananna.

2. KAFLI

INNHERJAUPPLÝSINGAR, INNHERJASVIK, ÓLÖGMÆT MIÐLUN INNHERJAUPPLÝSINGA OG MARKAÐSMISNOTKUN

7. gr.

Innherjaupplýsingar

1. Að því er varðar þessa reglugerð eru innherjaupplýsingar eftirfarandi tegundir upplýsinga:

a) nægjanlega tilgreindar upplýsingar sem ekki hafa verið gerðar opinberar og varða, beint eða óbeint, einn eða fleiri útgefendur eða einn eða fleiri fjármálagerninga og væru líklegar, yrðu þær gerðar opinberar, til að hafa marktæk áhrif á verð fjármálagerninganna eða verð tengdra afleiddra fjármálagerninga,

b) í tengslum við hrávöruafleiður, nægjanlega tilgreindar upplýsingar sem hafa ekki verið gerðar opinberar og varða, beint eða óbeint, eina eða fleiri slíkar afleiður, eða varða beint tengdan stundarsamning um hrávöru, og væru líklegar, yrðu þær gerðar opinberar, til að hafa marktæk áhrif á verð slíkra afleiðna eða tengdra stundarsamninga um hrávörur, og sé um að ræða upplýsingar sem ætla má að verði birtar opinberlega eða sem krafist er birtingar á í samræmi við ákvæði laga eða reglna á Sambands- eða landsvísu, markaðsreglur, samning, venju eða hefðir, á viðkomandi markaði með hrávöruafleiður eða stundarmarkaði,

c) í tengslum við losunarheimildir eða uppboðsvörur sem grundvallast á þeim, nægjanlega tilgreindar upplýsingar sem hafa ekki verið gerðar opinberar og varða, beint eða óbeint, einn eða fleiri slíka gerninga, og sem væru líklegar, yrðu þær gerðar opinberar, til að hafa marktæk áhrif á verð slíkra gerninga eða tengdra afleiddra fjármálagerninga,

d) að því er varðar aðila sem hefur verið falið að framkvæma fyrirmæli um fjármálagerninga eru það einnig upplýsingar sem viðskiptavinur veitir, tengjast óafgreiddum fyrirmælum hans um fjármálagerninga, eru nægjanlega tilgreindar og varða, beint eða óbeint, einn eða fleiri útgefendur eða einn eða fleiri fjármálagerninga og væru líklegar, yrðu þær gerðar opinberar, til að hafa marktæk áhrif á verð fjármálagerninganna, verð tengdra stundarsamninga um hrávörur eða verð tengdra afleiddra fjármálagerninga.

2. Við beitingu 1. mgr. skal litið svo á að upplýsingar séu nægjanlega tilgreindar ef þær gefa til kynna aðstæður sem eru fyrir hendi eða sem ætla má að verði fyrir hendi eða atburð sem hefur átt sér stað eða sem ætla má að muni eiga sér stað, ef þær eru nægilega nákvæmar til að unnt sé að draga ályktun um möguleg áhrif þeirra aðstæðna eða atburðar á verð fjármálagerninga eða afleiddra fjármálagerninga sem þeim tengjast, tengdra stundarsamninga um hrávörur eða uppboðsvara sem grundvallast á losunarheimildum. Sé í þessu sambandi um að ræða langvarandi ferli sem ætlað er að ná fram, eða sem veldur, tilteknum aðstæðum eða tilteknum atburði má líta á þessar framtíðaraðstæður eða -atburð, og milliþrep í ferlinu sem tengjast því að ná fram eða valda þessum framtíðaraðstæðum eða -atburði, sem nægjanlega tilgreindar upplýsingar.

3. Milliþrep í langvarandi ferli telst vera innherjaupplýsingar ef það, eitt og sér, uppfyllir skilyrði um innherjaupplýsingar sem um getur í þessari grein.

4. Að því er varðar 1. mgr. eru upplýsingar sem væru líklegar, yrðu þær gerðar opinberar, til að hafa marktæk áhrif á verð fjármálagerninga, afleiddra fjármálagerninga, stundarsamninga um hrávörur sem þeim tengjast eða uppboðsvara sem grundvallast á losunarheimildum þær upplýsingar sem upplýstur fjárfestir er líklegur til að nota sem hluta af þeim grunni sem hann byggir fjárfestingarákvarðanir sínar á.

Sé um að ræða þátttakendur á markaðnum með losunarheimildir með samanlagða losun eða nafnvarmaafl við eða undir þeim viðmiðunarmörkum sem sett eru í samræmi við aðra undirgrein 2. mgr. 17. gr. teljast upplýsingar um raunlæga starfsemi þeirra ekki hafa marktæk áhrif á verð losunarheimilda, uppboðsvara sem grundvallast á þeim eða afleiddra fjármálagerninga.

5. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal gefa út viðmiðunarreglur til að gera lista til viðmiðunar, sem ekki er tæmandi, yfir upplýsingar sem ætla má að verði birtar eða sem krafist er birtingar á í samræmi við ákvæði laga eða reglna á Sambands- eða landsvísu, markaðsreglur, samning, venju eða hefðir, á viðkomandi markaði með hrávöruafleiður eða stundarmarkaði eins og um getur í b-lið 1. mgr. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal taka tilhlýðilegt tillit til sérstakra eiginleika þessara markaða.

8. gr.

Innherjasvik

1. Að því er varðar þessa reglugerð teljast það innherjasvik ef aðili býr yfir innherjaupplýsingum og notar þær til að kaupa eða selja, fyrir eigin reikning eða reikning þriðja aðila, beint eða óbeint, fjármálagerninga sem þær upplýsingar varða. Notkun innherjaupplýsinga til að afturkalla eða breyta fyrirmælum í tengslum við fjármálagerning sem upplýsingarnar varða telst einnig innherjasvik ef fyrirmælin voru lögð fram áður en hlutaðeigandi aðili bjó yfir innherjaupplýsingunum. Í tengslum við uppboð á losunarheimildum eða öðrum uppboðsvörum sem grundvallast á þeim sem eru haldin samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010 fellur það einnig undir notkun innherjaupplýsinga að aðili leggi fram, breyti eða afturkalli kauptilboð fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila.

2. Að því er varðar þessa reglugerð telst það ráðlegging um að annar aðili taki þátt í innherjasvikum, eða hvatningu til að taka þátt í innherjasvikum, ef aðili býr yfir innherjaupplýsingum og:

a) ráðleggur, á grundvelli þeirra upplýsinga, að hinn aðilinn kaupi eða selji fjármálagerninga sem upplýsingarnar varða, eða hvetur til þess að sá aðili ráðist í slík kaup eða sölu eða

b) ráðleggur, á grundvelli þeirra upplýsinga, að hinn aðilinn afturkalli eða breyti fyrirmælum í tengslum við fjármálagerning sem þær upplýsingar varða, eða hvetur til að sá aðili ráðist í slíka afturköllun eða breytingu.

3. Sé farið að ráðleggingum eða hvatningu eins og um getur í 2. mgr. telst það innherjasvik í skilningi þessarar greinar ef aðilinn sem fer eftir ráðleggingunni eða hvatningunni veit eða ætti að vita að hún grundvallast á innherjaupplýsingum.

4. Þessi grein gildir um alla aðila sem búa yfir innherjaupplýsingum vegna:

a) setu sinnar í stjórn, starfs síns í framkvæmdastjórn eða eftirlitseiningum útgefandans eða þátttakandans á markaði með losunarheimildir,

b) hlutdeildar í hlutafé útgefandans eða þátttakandans á markaði með losunarheimildir,

c) aðgangs að upplýsingum í krafti starfs, stöðu eða skyldna sinna eða

d) þess að þeir eru viðriðnir refsiverða háttsemi.

Þessi grein gildir einnig um alla aðila sem búa yfir innherjaupplýsingum við aðrar aðstæður en þær sem um getur í fyrstu undirgrein ef viðkomandi aðili veit eða ætti að vita að um innherjaupplýsingar er að ræða.

5. Sé aðilinn lögaðili gildir þessi grein einnig, í samræmi við landslög, um þá einstaklinga sem taka þátt í ákvörðuninni um að ráðast í kaupin, söluna, afturköllunina eða breytinguna á fyrirmælum fyrir reikning hlutaðeigandi lögaðila.

9. gr.

Lögmæt hegðun

1. Að því er varðar 8. og 14. gr. telst það eitt að lögaðili búi yfir, eða hafi búið yfir, innherjaupplýsingum ekki jafngilda því að hann hafi notað þær upplýsingar og þar með framið innherjasvik á grundvelli kaupa eða sölu, ef sá lögaðili:

a) hefur komið á, hrundið í framkvæmd og viðhaldið fullnægjandi og skilvirku fyrirkomulagi og verklagi sem tryggir á skilvirkan hátt að hvorki einstaklingurinn sem tók ákvörðunina fyrir hans hönd um að kaupa eða selja fjármálagerninga sem upplýsingarnar varða, né annar einstaklingur sem kann að hafa haft áhrif á þá ákvörðun, hafi búið yfir innherjaupplýsingunum og

b) hefur ekki hvatt, ráðlagt , talið á eða með öðrum hætti haft slík áhrif á einstaklinginn sem, fyrir hönd lögaðilans, keypti eða seldi þá fjármálagerninga sem upplýsingarnar varða.

2. Að því er varðar 8. og 14. gr. telst það eitt að aðili búi yfir innherjaupplýsingum ekki jafngilda því að hann hafi notað þær upplýsingar og þar með framið innherjasvik á grundvelli kaupa eða sölu, ef sá aðili:

a) er, að því er varðar fjármálagerninginn sem þær upplýsingar varða, viðskiptavaki eða hefur heimild til að koma fram sem mótaðili, og kaup eða sala fjármálagerningsins sem þær upplýsingar varða fer fram á lögmætan hátt í eðlilegu sambandi við starfsemi hans sem viðskiptavaka eða mótaðila fyrir þann fjármálagerning, eða

b) hefur heimild til að framkvæma fyrirmæli fyrir hönd þriðju aðila og kaupin eða salan á fjármálagerningunum sem fyrirmælin varða fara fram til að framkvæma slík fyrirmæli á lögmætan hátt í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur þess aðila.

3. Að því er varðar 8. og 14. gr. telst það eitt að aðili búi yfir innherjaupplýsingum ekki jafngilda því að hann hafi notað þær upplýsingar og þar með framið innherjasvik á grundvelli kaupa eða sölu ef hann á í viðskiptum til að kaupa eða selja fjármálagerninga og þau viðskipti fara fram til að standa í góðri trú við skuldbindingu sem er gjaldfallin en ekki til að sniðganga bann gegn innherjasvikum og:

a) að sú skuldbinding er vegna fyrirmæla sem lögð voru fram eða samnings sem gerður var áður en hlutaðeigandi aðili komst yfir innherjaupplýsingarnar eða

b) ráðist er í viðkomandi viðskipti til að uppfylla skyldu samkvæmt lögum eða reglum sem stofnaðist áður en hlutaðeigandi aðili bjó yfir innherjaupplýsingunum.

4. Að því er varðar 8. og 14. gr. telst það eitt að aðili búi yfir innherjaupplýsingum ekki jafngilda því að hann hafi notað þær upplýsingar og þar með framið innherjasvik ef hann fékk þær innherjaupplýsingar við framkvæmd opinberrar yfirtöku eða samruna við félag og notar þær innherjaupplýsingar eingöngu í þeim tilgangi að framkvæma samrunann eða yfirtökuna, að því tilskildu að þegar hluthafar félagsins samþykkja samrunann eða tilboðið hafi allar innherjaupplýsingar verið gerðar opinberar eða séu með öðrum hætti ekki lengur innherjaupplýsingar.

Þessi málsgrein gildir ekki um uppbyggingu eignarhluta.

5. Að því er varðar 8. og 14. gr. telst það eitt að aðili noti eigin vitneskju um að hann hafi ákveðið að kaupa eða selja fjármálagerninga við kaup eða sölu þeirra ekki fela í sér notkun innherjaupplýsinga

6. Þrátt fyrir 1.–5. mgr. þessarar greinar getur brot gegn banninu við innherjasvikum sem kveðið er á um í 14. gr. samt talist hafa átt sér stað ef lögbært yfirvald kemst að þeirri niðurstöðu að ólögmæt ástæða hafi verið fyrir fyrirmælunum um að eiga viðskipti, fyrir viðskiptunum eða fyrir viðkomandi hegðun.

10. gr.

Ólögmæt miðlun innherjaupplýsinga

1. Að því er varðar þessa reglugerð telst það ólögmæt miðlun innherjaupplýsinga ef aðili býr yfir innherjaupplýsingum og miðlar þeim til annars aðila, nema miðlunin fari fram í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur.

Þessi málsgrein gildir um alla einstaklinga og lögaðila við þær aðstæður sem um getur í 4. mgr. 8. gr.

2. Að því er varðar þessa reglugerð telst áframmiðlun ráðlegginga eða hvatningar sem um getur í 2. mgr. 8. gr. vera ólögmæt miðlun innherjaupplýsinga samkvæmt þessari grein ef aðilinn sem miðlar ráðleggingunni eða hvatningunni veit eða ætti að vita að hún grundvallast á innherjaupplýsingum.

11. gr.

Markaðsþreifingar

1. Markaðsþreifing (e. *market sounding*) felur í sér veitingu upplýsinga, áður en tilkynnt er um viðskipti, til eins eða fleiri mögulegra fjárfesta til að kanna áhuga þeirra á mögulegum viðskiptum og skilyrði sem varða þau, s.s. mögulegt umfang þeirra eða verðlagningu, frá:

a) útgefanda,

b) tilboðsgjafa fjármálagernings á eftirmarkaði, í slíku magni eða slíku virði að viðskiptin greina sig frá venjulegum viðskiptum og fela í sér söluaðferð sem grundvallast á fyrirframmati á mögulegum áhuga mögulegra fjárfesta,

c) þátttakanda á markaði með losunarheimildir eða

d) þriðja aðila sem kemur fram fyrir hönd eða fyrir reikning aðila sem um getur í a-, b- eða c-lið.

2. Án þess að hafa áhrif á 3. mgr. 23. gr. telst það einnig markaðsþreifing ef aðili sem hyggst gera yfirtökutilboð í verðbréf félags, eða hyggur á samruna við félag, miðlar til aðila sem ráða yfir verðbréfunum, innherjaupplýsingum, að því tilskildu að:

a) upplýsingarnar séu nauðsynlegar til að gera aðilunum sem eiga rétt á verðbréfunum kleift að mynda sér skoðun á því hvort þeir vilja bjóða verðbréf sín og

b) eðlilegt sé að ákvörðunin um að gera yfirtökutilboðið eða um samrunann krefjist þess að þeir aðilar sem eiga rétt á verðbréfunum séu fúsir til að bjóða verðbréf sín.

3. Markaðsaðili sem miðlar upplýsingum skal, áður en hann framkvæmir markaðsþreifingu, taka sérstaklega til athugunar hvort markaðsþreifingin felur í sér miðlun innherjaupplýsinga. Markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum skal gera skriflega grein fyrir niðurstöðu sinni og ástæðum hennar. Hann skal einnig afhenda lögbæra yfirvaldinu slíkar skriflegar greinargerðir sé þess óskað. Þessi skylda á við um hverja miðlun upplýsinga á meðan markaðsþreifingin stendur yfir. Markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum skal uppfæra skriflegar greinargerðir sem um getur í þessari málsgrein til samræmis við það.

4. Að því er varðar 1. mgr. 10. gr. telst miðlun innherjaupplýsinga meðan á markaðsþreifingu stendur vera í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur aðila ef markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum uppfyllir ákvæði 3. og 5. mgr. þessarar greinar.

5. Að því er varðar 4. mgr. skal markaðsaðilinn, sem miðlar upplýsingunum, áður en hann miðlar þeim:

a) fá samþykki aðilans sem markaðsþreifingin beinist til fyrir að hann fái innherjaupplýsingar,

b) upplýsa aðilann sem markaðsþreifingingin beinist til um að honum sé óheimilt að nota þær upplýsingar, eða reyna að nota þær, til að kaupa eða selja, fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila, beint eða óbeint, fjármálagerninga sem þær upplýsingar varða,

c) upplýsa aðilann sem markaðsþreifingingin beinist til um að honum sé óheimilt að nota þær upplýsingar, eða reyna að nota þær, með því að afturkalla eða breyta fyrirmælum sem hafa þegar verið gefin í tengslum við fjármálagerning sem þær upplýsingar varða og

d) upplýsa aðilann sem markaðsþreifingingin beinist til um að með því að samþykkja að taka við upplýsingunum skuldbindi hann sig til að halda trúnað um þær.

Markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum skal gera og halda skrá með öllum upplýsingum sem veittar eru aðilanum sem markaðsþreifingingin beinist til, þ.m.t. upplýsingum sem veittar eru í samræmi við a- til d-lið fyrstu undirgreinar, og upplýsingum um deili á mögulegum fjárfestum sem upplýsingunum hefur verið miðlað til, þ.m.t., en þó ekki takmarkað við, lögaðila og einstaklinga sem koma fram fyrir hönd hins mögulega fjárfestis, og dagsetningu og tíma hverrar miðlunar. Markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingunum skal afhenda lögbæra yfirvaldinu þá skrá sé þess óskað.

6. Séu upplýsingar sem hefur verið miðlað við markaðsþreifingu ekki lengur innherjaupplýsingar að mati markaðsaðilans sem miðlaði þeim skal hann upplýsa viðtakandann um það eins fljótt og unnt er.

Markaðsaðilinn sem miðlaði upplýsingunum skal halda skrá yfir þær upplýsingar sem miðlað er í samræmi við þessa málsgrein og afhenda hana lögbæra yfirvaldinu sé þess óskað.

7. Þrátt fyrir ákvæði þessarar greinar skal aðilinn sem markaðsþreifingin beinist til sjálfur meta hvort hann býr yfir innherjaupplýsingum og hvenær hann býr ekki lengur yfir innherjaupplýsingum.

8. Markaðsaðilinn sem miðlar upplýsingum skal varðveita þær skrár sem um getur í þessari grein í að lágmarki fimm ár.

9. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum til að ákvarða viðeigandi fyrirkomulag, verklag og kröfur um skráahald fyrir aðila svo þeir uppfylli þær kröfur sem mælt er fyrir um í 4., 5., 6. og 8. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

10. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að tilgreina þau kerfi og snið tilkynninga sem aðilar skulu nota til að uppfylla þær kröfur sem gerðar eru með 4., 5., 6. og 8. mgr. þessarar greinar, einkum nákvæmlega það snið skránna sem um getur í 4.–8. mgr. og tæknilegar aðferðir til viðeigandi veitingar þeirra upplýsinga sem um getur í 6. mgr. til aðilans sem markaðsþreifingin beinist til.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdastaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

11. Evrópska bankaeftirlitsstofnunin skal gefa út viðmiðunarreglur í samræmi við 16. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010 sem beint er til aðila sem markaðsþreifingar beinast til, að því er varðar:

a) þá þætti sem slíkir aðilar skulu taka tillit til þegar upplýsingum er miðlað til þeirra sem hluti af markaðsþreifingu, svo þeir geti metið hvort upplýsingarnar séu innherjaupplýsingar,

b) þær ráðstafanir sem slíkir aðilar skulu gera, ef innherjaupplýsingum hefur verið miðlað til þeirra, til að uppfylla ákvæði 8. og 10. gr. þessarar reglugerðar og

c) þær skrár sem slíkir aðilar skulu halda til að sýna fram á að þeir hafi uppfyllt ákvæði 8. og 10. gr. þessarar reglugerðar.

12. gr.

Markaðsmisnotkun

1. Að því er varðar þessa reglugerð tekur markaðsmisnotkun til eftirfarandi athæfis:

a) að eiga í viðskiptum, leggja fram viðskiptafyrirmæli eða önnur hegðun sem:

i. gefur, eða líklegt er að gefi, ranga eða villandi mynd af framboði á, eftirspurn eftir eða verði fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum eða

ii. tryggir, eða líklegt er að tryggi, óeðlilegt eða tilbúið verð eins eða fleiri fjármálagerninga, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum,

nema aðilinn sem á í viðskiptum, leggur fram viðskiptafyrirmæli eða sýnir af sér viðkomandi aðra hegðun sýni fram á að þau viðskipti, fyrirmæli eða sú hegðun eigi sér lögmætar ástæður og samræmist viðurkenndri markaðsframkvæmd eins og ákvarðað er skv. 13. gr.,

b) að eiga í viðskiptum, leggja fram viðskiptafyrirmæli eða sýna af sér annað athæfi eða hegðun sem hefur áhrif, eða er líklegt til að hafa áhrif, á verð eins eða fleiri fjármálagerninga, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum, með slíkum hætti að tilbúningi eða öðru formi blekkingar eða klækja er beitt,

c) að dreifa upplýsingum gegnum fjölmiðla, þ.m.t. netið, eða með einhverjum öðrum hætti, sem gefa eða eru líklegar til að gefa ranga eða villandi mynd af framboði á, eftirspurn eftir eða verði fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum, eða sem tryggja eða eru líklegar til að tryggja óeðlilegt eða tilbúið verð eins eða fleiri fjármálagerninga, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum, þ.m.t. að dreifa orðrómi, ef aðilinn sem dreifði upplýsingunum vissi, eða hefði mátt vita, að þær væru rangar eða villandi,

d) að senda rangar eða villandi upplýsingar eða leggja fram röng eða villandi inntaksgögn í tengslum við viðmiðunargildi ef aðilinn sem sendi upplýsingarnar eða lagði fram inntaksgögnin vissi, eða hefði mátt vita, að þau væru röng eða villandi, eða önnur hegðun sem felur í sér fölsun á útreikningi viðmiðunargildis.

2. Meðal annars eftirfarandi hegðun telst vera markaðsmisnotkun:

a) það að aðili eða nokkrir aðilar í samstarfi aðhafist til ná markaðsráðandi stöðu yfir framboði á eða eftirspurn eftir fjármálagerningi, tengdum stundarsamningi um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum, sem hefur í för með sér, eða er líklegt til að hafa í för með sér, beina eða óbeina stýringu á kaup- eða söluverði eða skapar, eða er líklegt til að skapa, önnur ósanngjörn viðskiptaskilyrði,

b) kaup eða sala á fjármálagerningum, við opnun eða lokun markaðar, sem er villandi, eða líkleg til að vera villandi, fyrir fjárfesta sem aðhafast á grundvelli birts verðs, þ.m.t. opnunar- eða lokaverðs,

c) að leggja fram fyrirmæli á viðskiptavettvangi, þ.m.t. afturköllun eða breyting á fyrirmælum, með tiltækum viðskipta-aðferðum, þ.m.t. með rafrænum hætti, s.s. algríms- og hátíðniviðskiptum, sem hafa einhver þau áhrif sem um getur í a- eða b-lið 1. mgr. með því að:

i. trufla eða tefja virkni viðskiptakerfis viðskiptavettvangsins eða vera líkleg til að gera það,

ii. torvelda öðrum aðilum að greina raunveruleg fyrirmæli í viðskiptakerfi viðskiptavettvangsins, eða vera líkleg til að gera það, þ.m.t. með því að setja inn fyrirmæli sem valda yfirálagi eða röskun á tilboðaskránni eða

iii. gefa, eða vera líkleg til að gefa ranga eða villandi mynd af framboði á, eftirspurn eftir eða verði fjármálagernings, einkum með því að setja inn fyrirmæli til að setja af stað eða auka tiltekna leitni,

d) að notfæra sér, öðru hverju eða reglulega, aðgang að hefðbundnum eða rafrænum miðlum til að láta í ljós álit sitt á fjármálagerningi, tengdum stundarsamningi um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum (eða, óbeint, láta í ljós álit sitt á útgefandanum) og hafa áður tekið stöður í þeim gerningi, tengdum stundarsamningi um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum og hagnast síðan á áhrifum þess álits sem látið er í ljós á verð þess gernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum, án þess að hafa á sama tíma greint opinberlega frá þeim hagsmunaárekstri á tilhlýðilegan og skilvirkan hátt,

e) kaup eða sala á eftirmarkaði á losunarheimildum eða skyldum afleiðum áður en uppboð fer fram samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010, sem hefur þau áhrif að halda uppboðsverði uppboðsvöru á óeðlilegu eða tilbúnu stigi eða að blekkja bjóðendur í uppboðunum.

3. Að því er varðar beitingu a- og b-liðar 1. mgr., og án þess að hafa áhrif á þá hegðun sem um getur í 2. mgr., er í I. viðauka að finna viðmið, sem ekki eru tæmandi, um beitingu uppspuna eða annarra forma blekkingar eða klækja , auk viðmiða, sem ekki eru tæmandi, um það hvort gefin er röng eða villandi mynd og hvort leitast er við að tryggja óeðlilegt verð.

4. Sé sá aðili sem um getur í þessari grein lögaðili gildir þessi grein einnig, í samræmi við landslög, um þá einstaklinga sem taka þátt í þeirri ákvörðun að aðhafast fyrir reikning hlutaðeigandi lögaðila.

5. Framkvæmdastjórninni skal falið vald til að samþykkja framseldar gerðir, í samræmi við 35. gr., sem tilgreina þau viðmið sem mælt er fyrir um í I. viðauka, til að skýra þætti þeirra og taka tillit til tækniþróunar á fjármálamörkuðum.

13. gr.

Viðurkennd markaðsframkvæmd

1. Bannið sem um getur í 15. gr. gildir ekki um það athæfi sem um getur í a-lið 1. mgr. 12. gr., að því tilskildu að aðilinn sem á í viðskiptum, leggur fram viðskiptafyrirmæli eða sýnir af sér viðkomandi aðra hegðun sýni fram á að þau viðskipti, fyrirmæli eða sú hegðun eigi sér lögmætar ástæður og samræmist viðurkenndri markaðsframkvæmd eins og hún er ákvörðuð samkvæmt þessari grein.

2. Lögbæru yfirvaldi er heimilt að ákvarða að um sé að ræða viðurkennda markaðsframkvæmd með tilliti til eftirfarandi viðmiða:

a) hvort markaðsframkvæmdin veitir umtalsvert gagnsæi á markaðnum,

b) hvort markaðsframkvæmdin tryggir mikla vernd fyrir starfsemi markaðsafla og eðlilegt samspil framboðs og eftirspurnar,

c) hvort markaðsframkvæmdin hefur jákvæð áhrif á seljanleika og skilvirkni á markaði,

d) hvort með viðkomandi markaðsframkvæmd sé tekið tillit til viðskiptafyrirkomulags viðkomandi markaðar og markaðsaðilum gert kleift að bregðast á tilhlýðilegan hátt og tímanlega við þeim nýju markaðsaðstæðum sem framkvæmdin skapar,

e) hvort markaðsframkvæmdin veldur áhættu fyrir heilleika beint eða óbeint tengdra markaða, hvort sem þeir eru skipulegir eða ekki, með viðkomandi fjármálagerning innan Sambandsins,

f) niðurstaðna hvers kyns rannsóknar lögbærs yfirvalds eða annars yfirvalds á viðkomandi markaðsframkvæmd, einkum hvort hún brýtur í bága við lög eða reglur sem ætlað er að koma í veg fyrir markaðssvik eða við siðareglur, án tillits til þess hvort hún varðar viðkomandi markað eða beint eða óbeint tengda markaði innan Sambandsins, og

g) eiginleika í uppbyggingu viðkomandi markaðar, m.a. hvort hann er skipulegur eða ekki, tegunda fjármálagerninga sem viðskipti eru með og tegunda markaðsaðila, þ.m.t. hve mikil þátttaka almennra fjárfesta er á viðkomandi markaði.

Markaðsframkvæmd sem lögbært yfirvald hefur viðurkennt á tilteknum markaði telst ekki gilda um aðra markaði nema lögbær yfirvöld þeirra markaða hafi samþykkt þá framkvæmd samkvæmt þessari grein.

3. Áður en lögbært yfirvald viðurkennir markaðsframkvæmd í samræmi við 2. mgr. skal það tilkynna Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni og öðrum lögbærum yfirvöldum um þá fyrirætlan sína að viðurkenna markaðsframkvæmd og veita upplýsingar um matið sem skal gert í samræmi við þau viðmið sem mælt er fyrir um í 2. mgr. Slíka tilkynningu skal senda a.m.k. þremur mánuðum áður en viðurkenndu markaðsframkvæmdinni er ætlað að taka gildi.

4. Innan tveggja mánaða frá viðtöku tilkynningarinnar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin veita lögbæra yfirvaldinu sem sendir tilkynninguna álit á því hvort viðurkennda markaðsframkvæmdin samræmist 2. mgr. og þeim tæknilegu eftirlitsstöðlum sem samþykktir eru skv. 7. mgr. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal einnig meta hvort viðurkenning markaðsframkvæmdarinnar myndi ógna tiltrú markaðarins á fjármálamarkaði Sambandsins. Álitið skal birt á vefsetri Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar.

5. Viðurkenni lögbært yfirvald markaðsframkvæmd þvert á álit Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar sem veitt er í samræmi við 4. mgr. skal það birta tilkynningu á vefsetri sínu innan 24 klukkustunda frá því að framkvæmdin er viðurkennd, með fullum rökstuðningi, þ.m.t. fyrir því hvers vegna viðurkennda markaðsframkvæmdin ógnar ekki tiltrú á markaði.

6. Telji lögbært yfirvald að annað lögbært yfirvald hafi viðurkennt markaðsframkvæmd sem uppfyllir ekki viðmiðin í 2. mgr. skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin aðstoða hlutaðeigandi yfirvöld við að komast að samkomulagi í samræmi við valdheimildir sínar skv. 19. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

Komist hlutaðeigandi lögbær yfirvöld ekki að samkomulagi getur Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin tekið ákvörðun í samræmi við 3. mgr. 19. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

7. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum sem tilgreina viðmið, verklag og kröfur um viðurkenningu markaðsframkvæmdar skv. 2., 3. og 4. mgr. og kröfur í tengslum við að viðhalda henni, fella hana úr gildi eða breyta skilyrðum um viðurkenningu hennar.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

8. Lögbær yfirvöld skulu endurskoða reglulega, a.m.k. á tveggja ára fresti, þá markaðsframkvæmd sem þau hafa viðurkennt, einkum með tilliti til verulegra breytinga á viðkomandi markaðsumhverfi, s.s. breytinga á viðskiptareglum eða markaðsinnviðum, með það fyrir augum að ákveða hvort eigi að viðhalda henni, nema hana úr gildi eða breyta skilyrðunum fyrir viðurkenningu hennar.

9. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal birta á vefsetri sínu lista yfir viðurkennda markaðsframkvæmd og í hvaða aðildarríkjum hún gildir.

10. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal hafa eftirlit með beitingu viðurkenndrar markaðsframkvæmdar og leggja fram árlega skýrslu til framkvæmdastjórnarinnar um það með hvaða hætti framkvæmdinni er beitt á viðkomandi mörkuðum.

11. Lögbær yfirvöld skulu tilkynna Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni um þá markaðsframkvæmd sem þau hafa viðurkennt fyrir 2. júlí 2014 innan þriggja mánaða frá gildistöku þeirra tæknilegu eftirlitsstaðla sem um getur í 7. mgr.

Sú viðurkennda markaðsframkvæmd sem um getur í fyrstu undirgrein þessarar málsgreinar skal gilda áfram í viðkomandi aðildarríkjum þar til lögbært yfirvald hefur tekið ákvörðun um áframhald þeirrar framkvæmdar að fengnu áliti Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar skv. 4. mgr.

14. gr.

Bann við innherjasvikum og ólögmætri miðlun innherjaupplýsinga

Aðili skal ekki:

a) taka þátt eða gera tilraun til að taka þátt í innherjasvikum,

b) ráðleggja að annar aðili taki þátt í innherjasvikum eða hvetja annan aðila til að taka þátt í innherjasvikum né

c) miðla innherjaupplýsingum með ólögmætum hætti.

15. gr.

Bann við markaðsmisnotkun

Aðili skal hvorki taka þátt né gera tilraun til að taka þátt í markaðsmisnotkun.

16. gr.

Fyrirbygging og greining markaðssvika

1. Rekstraraðilar markaða og verðbréfafyrirtæki sem starfrækja viðskiptavettvang skulu koma á fót og viðhalda skilvirku fyrirkomulagi, kerfum og verklagi sem miða að því að koma í veg fyrir og greina innherjasvik, markaðsmisnotkun og tilraunir til innherjasvika og markaðsmisnotkunar, í samræmi við 31. og 54. gr. tilskipunar 2014/65/ESB.

Aðili sem um getur í fyrstu undirgrein skal án tafar tilkynna lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins um fyrirmæli og viðskipti, þ.m.t. afturköllun eða breytingu á þeim, sem gætu falið í sér innherjasvik, markaðsmisnotkun eða tilraun til innherjasvika og markaðsmisnotkunar.

2. Aðili sem sér um eða framkvæmir viðskipti í atvinnuskyni skal koma á og viðhalda skilvirku fyrirkomulagi, kerfum og verklagi til að greina og tilkynna um grunsamleg fyrirmæli og viðskipti. Hafi slíkur aðili réttmætan grun um að fyrirmæli eða viðskipti með fjármálagerning, hvort sem þau eru gefin eða framkvæmd innan eða utan viðskiptavettvangs, gætu falið í sér innherjasvik, markaðsmisnotkun eða tilraun til innherjasvika eða markaðsmisnotkunar skal aðilinn tilkynna lögbæru yfirvaldi sem um getur í 3. mgr. um það án tafar.

3. Án þess að hafa áhrif á 22. gr. lúta aðilar sem sjá um eða framkvæma viðskipti í atvinnuskyni þeim reglum sem gilda um tilkynningar í því aðildarríki þar sem þeir eru skráðir eða hafa höfuðstöðvar eða, sé um útibú að ræða, í aðildarríkinu þar sem útibúið er staðsett. Tilkynningunni skal beint til lögbærs yfirvalds í því aðildarríki.

4. Lögbær yfirvöld sem um getur í 3. mgr. og fá tilkynningu um grunsamleg fyrirmæli eða viðskipti skulu senda slíkar upplýsingar án tafar til lögbærra yfirvalda viðkomandi viðskiptavettvanga.

5. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum til að ákvarða:

a) viðeigandi fyrirkomulag, kerfi og verklag til þess að aðilar uppfylli þær kröfur sem komið er á skv. 1. og 2. mgr. og

b) sniðmát tilkynninga sem aðilar skulu nota til að uppfylla þær kröfur sem komið er á skv. 1. og 2. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

3. KAFLI

UPPPLÝSINGASKYLDA

17. gr.

Opinber birting innherjaupplýsinga

1. Útgefandi skal birta almenningi eins fljótt og auðið er þær innherjaupplýsingar sem varða beint þann útgefanda.

Útgefandinn skal tryggja að innherjaupplýsingarnar séu gerðar opinberar með hætti sem gerir almenningi kleift að fá skjótan aðgang að upplýsingunum og að leggja fullt, rétt og tímanlegt mat á þær og, eftir atvikum, í opinbera kerfinu sem um getur í 21. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/109/EB ([1]). Útgefandinn skal ekki blanda saman annars vegar opinberri birtingu á innherjaupplýsingum og hins vegar markaðssetningu á starfsemi sinni. Útgefandinn skal birta og viðhalda á vefsetri sínu í a.m.k. fimm ár öllum innherjaupplýsingum sem honum ber að birta opinberlega.

Þessi grein gildir um útgefendur sem hafa óskað eftir eða heimilað töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á skipulegum markaði í aðildarríki eða, sé um að ræða gerninga sem aðeins eru viðskipti með á markaðstorgi fjármálagerninga eða á skipulegu markaðstorgi, útgefendur sem hafa heimilað viðskipti með fjármálagerninga sína á markaðstorgi fjármálagerninga eða á skipulegu markaðstorgi eða óskað eftir töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga í aðildarríki.

2. Þátttakandi á markaði með losunarheimildir skal birta opinberlega, á tímanlegan og skilvirkan hátt, innherjaupplýsingar sem varða losunarheimildir sem hann á vegna starfsemi sinnar, þ.m.t. flugstarfsemi eins og tilgreint er í I. viðauka við tilskipun 2003/87/EB eða vegna stöðva í skilningi e-liðar 3. gr. þeirrar tilskipunar sem hlutaðeigandi þátttakandi, eða móðurfélag hans eða tengt félag, á eða hefur yfirráð yfir eða vegna rekstrarþátta sem þátttakandinn, eða móðurfélag hans eða tengt félag, ber ábyrgð á að hluta til eða að öllu leyti. Að því er varðar stöðvar skal slík upplýsingagjöf taka til upplýsinga sem skipta máli fyrir afkastagetu og nýtingu stöðvanna, þ.m.t. skipulagðs eða fyrirvaralauss ótiltækileika slíkra stöðva.

Fyrsta undirgrein gildir ekki um markaðsaðila á markaði með losunarheimildir ef losun þeirra stöðva eða flugstarfsemi sem hann á, stýrir eða ber ábyrgð á hefur á næstliðnu ári ekki verið yfir lágmarksmörkum koltvísýringsígildis og, stundi hann brennslustarfsemi, ef nafnvarmaafl hans hefur ekki verið yfir lágmarksmörkum.

Framkvæmdastjórninni skal falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. sem tilgreina lágmark koltvísýringsígildis og lágmark nafnvarmaafls til beitingar á þeirri undanþágu sem kveðið er á um í annarri undirgrein þessarar greinar.

3. Framkvæmdastjórninni skal falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. sem tilgreina lögbæra yfirvaldið að því er varðar tilkynningar skv. 4. og 5. mgr. þessarar greinar.

4. Útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir getur, á eigin ábyrgð, frestað opinberri birtingu innherjaupplýsinga að því tilskildu að öll eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

a) tafarlaus birting upplýsinganna sé líkleg til að skaða lögmæta hagsmuni útgefandans eða þátttakanda á markaði með losunarheimildir,

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2004/109/EB frá 15. desember 2004 um samhæfingu krafna um gagnsæi í tengslum við upplýsingar um útgefendur verðbréfa sem eru skráð á skipulegan markað og um breytingu á tilskipun 2001/34/EB (Stjtíð. ESB L 390, 31.12.2004, bls. 38).

b) frestun á birtingu upplýsinganna sé ekki líkleg til að villa um fyrir almenningi,

c) útgefandinn eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir geti tryggt trúnað um þessar upplýsingar.

Sé um að ræða langvarandi ferli sem á sér stað í áföngum og er ætlað að ná fram, eða veldur, tilteknum aðstæðum eða tilteknum atburði getur útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir, á eigin ábyrgð, frestað opinberri birtingu innherjaupplýsinga sem varða þetta ferli, með fyrirvara um a-, b- og c-lið fyrstu undirgreinar.

Hafi útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir frestað birtingu innherjaupplýsinga samkvæmt þessari grein skal hann upplýsa lögbæra yfirvaldið sem tilgreint er skv. 3. mgr. um að birtingu upplýsinganna hafi verið frestað og leggja fram skriflega útskýringu á því hvernig skilyrði þessarar málsgreinar hafi verið uppfyllt, þegar í stað eftir að upplýsingarnar eru birtar almenningi. Að öðrum kosti geta aðildarríki kveðið á um að slíkar skrifleg útskýring sé aðeins lögð fram að fenginni beiðni lögbæra yfirvaldsins sem tilgreint er skv. 3. mgr.

5. Til að viðhalda stöðugleika fjármálakerfisins getur útgefandi sem er lánastofnun eða fjármálastofnun, á eigin ábyrgð, frestað opinberri birtingu innherjaupplýsinga, þ.m.t. upplýsinga sem varða tímabundna lausafjárerfiðleika og, sér í lagi, þörf á tímabundinni lausafjáraðstoð seðlabanka eða lánveitanda til þrautavara, að því tilskildu að öll eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

a) birting innherjaupplýsinganna feli í sér hættu á því að grafa undan fjármálastöðugleika útgefandans og fjármálakerfisins,

b) frestun á birtingu upplýsinganna þjóni almannahag,

c) unnt sé að tryggja trúnað um viðkomandi upplýsingar og

d) lögbæra yfirvaldið sem tilgreint er skv. 3. mgr. hafi samþykkt frestunina á grundvelli þess að skilyrði a-, b- og c-liðar séu uppfyllt.

6. Að því er varðar a- til d-lið 5. mgr. skal útgefandi tilkynna lögbæru yfirvaldi sem tilgreint er skv. 3. mgr. um þá fyrirætlan sína að fresta birtingu innherjaupplýsinga og leggja fram gögn sem sýna fram á að skilyrði a-, b- og c-liðar 5. mgr. séu uppfyllt. Lögbært yfirvald sem tilgreint er skv. 3. mgr. skal, eins og við á, hafa samráð við seðlabanka aðildarríkisins eða þjóðhagsvarúðaryfirvaldið, hafi slíku yfirvaldi verið komið á fót, eða að öðrum kosti eftirfarandi yfirvöld:

a) sé útgefandinn lánastofnun eða verðbréfafyrirtæki, yfirvaldið sem tilnefnt er í samræmi við 1. mgr. 133. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2013/36/ESB ([1]),

b) í öðrum tilvikum en þeim sem um getur í a-lið, hvert það annað landsyfirvald sem ber ábyrgð á eftirliti með útgefanda.

Lögbæra yfirvaldið sem tilgreint er skv. 3. mgr. skal tryggja að birtingu innherjaupplýsinganna sé aðeins frestað svo lengi sem nauðsynlegt er í almannaþágu. Lögbæra yfirvaldið sem tilgreint er skv. 3. mgr. skal meta a.m.k. vikulega hvort skilyrði a-, b- og c-liðar 5. mgr. séu enn uppfyllt.

Samþykki lögbært yfirvald sem tilgreint er skv. 3. mgr. ekki frestun á birtingu innherjaupplýsinganna skal útgefandinn birta þær án tafar.

Þessi málsgrein gildir um tilvik þar sem útgefandinn ákveður ekki að fresta birtingu innherjaupplýsinga í samræmi við 4. mgr.

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2013/36/ESB frá 26. júní 2013 um aðgang að starfsemi lánastofnana og varfærniseftirlit með lánastofnunum og verðbréfafyrirtækjum, um breytingu á tilskipun 2002/87/EB og um niðurfellingu á tilskipunum 2006/48/EB og 2006/49/EB (Stjtíð. ESB L 176, 27.6.2013, bls. 338).

Tilvísanir í þessari málsgrein í lögbært yfirvald sem tilgreint er skv. 3. mgr. hafa ekki áhrif á getu lögbæra yfirvaldsins til að sinna hlutverki sínu með nokkrum hætti sem um getur í 1. mgr. 23. gr.

7. Hafi birtingu innherjaupplýsinga verið frestað í samræmi við 4. eða 5. mgr. og trúnaður þessara innherjaupplýsinga er ekki lengur tryggður skal útgefandinn eða þátttakandinn á markaði með losunarheimildir birta þær innherjaupplýsingar almenningi eins fljótt og auðið er.

Þessi málsgrein tekur til aðstæðna þar sem orðrómur tengist með skýrum hætti innherjaupplýsingum sem birtingu hefur verið frestað á í samræmi við 4. eða 5. mgr., sé sá orðrómur nægilega réttur til að gefa til kynna að trúnaður þeirra upplýsinga sé ekki lengur tryggður.

8. Ef útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir, eða aðili sem kemur fram fyrir hans hönd eða aðhefst fyrir reikning hans, lætur þriðja aðila í té innherjaupplýsingar í eðlilegu sambandi við starf, stöðu eða skyldur sínar eins og um getur í 1. mgr. 10. gr. skal hann birta upplýsingarnar opinberlega á heildstæðan og skilvirkan hátt, samtímis ef birtingin er áformuð og eins fljótt og unnt er hafi birtingin ekki verið áformuð. Þessi málsgrein gildir ekki ef aðilinn sem tekur við upplýsingunum er bundinn þagnarskyldu, burtséð frá því hvort slík skylda grundvallast á lögum, reglum, félagssamþykktum eða samningi.

9. Birta má innherjaupplýsingar um útgefendur sem hafa fengið fjármálagerninga sína tekna til viðskipta á vaxtarmarkað fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki á vefsetri viðskiptavettvangsins í stað vefseturs útgefanda kjósi viðskiptavettvangurinn að veita útgefendum þá þjónustu á þeim markaði.

10. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að ákvarða:

a) tæknilegar leiðir til viðeigandi opinberrar birtingar innherjaupplýsinga, eins og um getur í 1., 2., 8. og 9. mgr., og

b) tæknilegar leiðir til að fresta opinberri birtingu innherjaupplýsinga eins og um getur í 4. og 5. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

11. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal gefa út viðmiðunarreglur um gerð lista til viðmiðunar, sem ekki er tæmandi, yfir lögmæta hagsmuni útgefenda, eins og um getur í a-lið 4. mgr., og yfir aðstæður þar sem frestun á birtingu innherjaupplýsinga er líkleg til að villa um fyrir almenningi eins og um getur í b-lið 4. mgr.

18. gr.

Innherjalistar

1. Útgefendur eða aðilar sem koma fram fyrir þeirra hönd eða aðhafast fyrir reikning þeirra skulu:

a) gera lista yfir alla aðila sem hafa aðgang að innherjaupplýsingum og starfa fyrir þá samkvæmt ráðningarsamningi, eða hafa á annan hátt með höndum verkefni sem þeir hafa aðgang að innherjaupplýsingum gegnum, s.s. ráðgjafa, endurskoðendur eða lánshæfismatsfyrirtæki (innherjalista),

b) uppfæra innherjalistann tafarlaust í samræmi við 4. mgr. og

c) afhenda lögbæru yfirvaldi innherjalistann eins fljótt og auðið er að beiðni þess.

2. Útgefendur eða aðilar sem koma fram fyrir þeirra hönd eða aðhafast fyrir þeirra reikning skulu gera allar eðlilegar ráðstafanir til að tryggja að allir aðilar á innherjalistanum viðurkenni skriflega þær skyldur samkvæmt lögum og reglum sem því fylgir og geri sér grein fyrir þeim viðurlögum sem gilda um innherjasvik og ólögmæta miðlun innherjaupplýsinga.

Ef annar aðili sem kemur fram fyrir hönd eða aðhefst fyrir reikning útgefanda tekur að sér það verkefni að gera og uppfæra innherjalistann ber útgefandinn áfram fulla ábyrgð á því að farið sé að ákvæðum þessarar greinar. Útgefandinn skal ávallt halda rétti sínum til aðgangs að innherjalistanum.

3. Innherjalistinn skal tilgreina a.m.k.:

a) deili á hverjum þeim aðila sem hefur aðgang að innherjaupplýsingum,

b) ástæður þess að viðkomandi aðili er á innherjalistanum,

c) dagsetningu og tíma þegar aðilinn fékk aðgang að innherjaupplýsingunum og

d) dagsetninguna þegar innherjalistinn var gerður.

4. Útgefendur eða aðilar sem koma fram fyrir þeirra hönd eða aðhafast fyrir reikning þeirra skulu uppfæra innherjalistann án tafar, þ.m.t. dagsetningu uppfærslunnar, við eftirfarandi aðstæður:

a) ef breyting verður á ástæðu þess að hafa aðila á innherjalistanum sem þegar er á honum,

b) ef nýr aðili fær aðgang að innherjaupplýsingum og því þarf að bæta honum á innherjalistann og

c) ef aðili hefur ekki lengur aðgang að innherjaupplýsingum.

Hver uppfærsla skal tilgreina dagsetningu og tíma þegar breytingin sem veldur uppfærslunni átti sér stað.

5. Útgefendur eða aðilar sem koma fram fyrir þeirra hönd eða aðhafast fyrir reikning þeirra skulu geyma innherjalistann í minnst fimm ár eftir gerð hans eða uppfærslu.

6. Útgefendur sem hafa fengið fjármálagerninga sína tekna til viðskipta á vaxtarmarkaði fyrir lítil og meðalstór fyrirtæki, skulu undanþegnir því að gera innherjalista, að eftirfarandi skilyrðum uppfylltum:

a) að útgefandi geri allar eðlilegar ráðstafanir til að tryggja að allir aðilar sem hafa aðgang að innherjaupplýsingum viðurkenni þær skyldur sem því fylgir samkvæmt lögum og reglum og geri sér grein fyrir þeim viðurlögum sem gilda um innherjasvik og ólögmæta miðlun innherjaupplýsinga og

b) að útgefandinn geti afhent lögbæru yfirvaldi innherjalista samkvæmt beiðni.

7. Þessi grein gildir um útgefendur sem hafa óskað eftir eða heimilað töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á skipulegum markaði í aðildarríki eða, sé um að ræða gerning sem aðeins eru viðskipti með á markaðstorgi fjármálagerninga eða á skipulegu markaðstorgi, um útgefendur sem hafa heimilað viðskipti með fjármálagerninga sína á markaðstorgi fjármálagerninga eða á skipulegu markaðstorgi eða óskað eftir töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga í aðildarríki.

8. Ákvæði 1. og 5. mgr. þessarar greinar gilda einnig um:

a) þátttakendur á markaði með losunarheimildir í tengslum við innherjaupplýsingar um losunarheimildir sem eru afleiðing raunlægrar starfsemi þess þátttakanda á markaði með losunarheimildir,

b) alla uppboðsvettvanga, uppboðshaldara og uppboðsvaktara í tengslum við uppboð á losunarheimildum eða öðrum uppboðsvörum sem grundvallast á þeim, sem eru haldin samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010.

9. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum sem ákvarða nákvæmlega snið innherjalista og snið til uppfærslu á innherjalistum sem um getur í þessari grein.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

19. gr.

Viðskipti stjórnenda

1. Einstaklingar sem gegna stjórnunarstörfum og einstaklingar sem eru þeim nákomnir skulu tilkynna útgefanda eða þátttakanda á markaði með losunarheimildir og því lögbæra yfirvaldi sem um getur í annarri undirgrein 2. mgr.:

a) að því er varðar útgefendur, um öll viðskipti fyrir sinn eigin reikning sem eiga sér stað í tengslum við hlutabréf eða skuldagerninga þess útgefanda eða í tengslum við afleiður eða aðra fjármálagerninga sem þeim tengjast,

b) að því er varðar þátttakendur á markaði með losunarheimildir, um öll viðskipti fyrir sinn eigin reikning sem fara fram í tengslum við losunarheimildir, uppboðsvörur sem grundvallast á þeim eða afleiður sem þeim tengjast.

Slíka tilkynningu skal senda án tafar og eigi síðar en þremur viðskiptadögum eftir daginn sem viðskiptin fara fram.

Fyrsta undirgrein gildir þegar heildarfjárhæð viðskipta hefur náð þeim viðmiðunarmörkum sem sett eru fram í 8. eða 9. mgr., eftir því sem við á, innan almanaksárs.

2. Að því er varðar 1. mgr., og án þess að hafa áhrif á rétt aðildarríkja til að kveða á um annars konar tilkynningarskyldu en þá sem um getur í þessari grein, skal tilkynna lögbærum yfirvöldum um öll viðskipti sem fara fram fyrir reikning þeirra aðila sem um getur í 1. mgr. og skulu þeir aðilar annast tilkynninguna.

Þær reglur sem gilda um tilkynningar og aðilum sem um getur í 1. mgr. ber að hlíta skulu vera reglur aðildarríkisins þar sem útgefandinn eða þátttakandinn á markaði með losunarheimildir er skráður. Senda skal lögbæru yfirvaldi í því aðildarríki tilkynningarnar innan þriggja virkra daga frá viðskiptadegi. Sé útgefandinn ekki skráður í aðildarríki skal tilkynningin send lögbæru yfirvaldi heimaaðildarríkisins í samræmi við i. lið 1. mgr. 2. gr. tilskipunar 2004/109/EB eða, sé því ekki að skipta, lögbæru yfirvaldi viðskiptavettvangsins.

3. Útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir skal tryggja að þær upplýsingar sem tilkynntar eru í samræmi við 1. mgr. séu gerðar opinberar án tafar, eigi síðar en þremur viðskiptadögum eftir viðskiptin, með hætti sem veitir skjótan aðgang að upplýsingunum, án mismununar, í samræmi við þá tæknilegu framkvæmdarstaðla sem um getur í a-lið 10. mgr. 17. gr.

Útgefandi eða þátttakandi á markaði með losunarheimildir skal nota miðla sem eðlilegt er að reiða sig á til að dreifa upplýsingum á skilvirkan hátt til almennings alls staðar í Sambandinu og skal, eftir atvikum, nota opinbera kerfið sem um getur í 21. gr. tilskipunar 2004/109/EB.

Að öðrum kosti geta landslög kveðið á um að lögbært yfirvald geti sjálft gert upplýsingarnar opinberar.

4. Þessi grein gildir um útgefendur sem:

a) hafa óskað eftir eða heimilað töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á skipulegum markaði í aðildarríki eða,

b) sé um að ræða gerning sem aðeins eru viðskipti með á markaðstorgi fjármálagerninga eða skipulegu markaðstorgi, hafa heimilað viðskipti með fjármálagerninga sína á markaðstorgi fjármálagerninga eða skipulegu markaðstorgi eða óskað eftir töku fjármálagerninga sinna til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga.

5. Útgefendur og þátttakendur á markaði með losunarheimildir skulu tilkynna einstaklingum sem gegna stjórnunarstörfum skriflega um skyldur þeirra samkvæmt þessari grein. Útgefendur og þátttakendur á markaði með losunarheimildir skulu gera lista yfir alla einstaklinga sem gegna stjórnunarstörfum og einstaklinga sem eru nákomnir þeim.

Einstaklingar sem gegna stjórnunarstörfum skulu tilkynna einstaklingum sem eru nákomnir þeim skriflega um skyldur þeirra samkvæmt þessari grein og varðveita afrit af þeirri tilkynningu.

6. Í tilkynningu um viðskipti eins og um getur í 1. mgr. skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram:

a) nafn aðilans,

b) ástæða tilkynningar,

c) nafn viðkomandi útgefanda eða þátttakanda á markaði með losunarheimildir,

d) lýsing á fjármálagerningnum ásamt auðkenni hans,

e) eðli viðskiptanna (t.d. kaup eða sala), hvort þau tengjast nýtingu kaupréttar á hlutabréfum eða þeim tilteknu dæmum sem sett eru fram í 7. mgr.,

f) dagsetning og staður viðskiptanna og

g) verð og magn viðskiptanna. Sé um að ræða handveð með skilmálum sem kveða á um að virði þess breytist skulu þær upplýsingar koma fram ásamt virði þess á dagsetningu handveðsins.

7. Að því er varðar 1. mgr. skal einnig tilkynna um eftirfarandi viðskipti:

a) veðsetningu á eða lán fjármálagerninga af hálfu, eða fyrir hönd, einstaklings sem gegnir stjórnunarstörfum eða einstaklings sem er nákominn slíkum aðila, eins og um getur í 1. mgr.,

b) viðskipti aðila sem sjá um eða framkvæma viðskipti í atvinnuskyni eða annars aðila fyrir hönd einstaklings sem gegnir stjórnunarstörfum eða aðila sem er nákominn slíkum einstaklingi, eins og um getur í 1. mgr., þ.m.t. ef það er á grundvelli eigin ákvörðunar,

c) viðskipti sem fara fram samkvæmt líftryggingarsamningi, eins og hann er skilgreindur í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/138/EB ([1]) ef:

   i. líftryggingartakinn er einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum eða einstaklingur sem er nákominn slíkum einstaklingi, eins og um getur í 1. mgr.,

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/138/EB frá 25. nóvember 2009 um stofnun og rekstur fyrirtækja á sviði vátrygginga og endurtrygginga (Gjaldþolsáætlun II) (Stjtíð. ESB L 335, 17.12.2009, bls. 1).

ii. líftryggingartakinn ber fjárfestingaráhættuna og

iii. líftryggingartakinn hefur heimild eða ákvörðunarvald til að taka fjárfestingarákvarðanir um tiltekna gerninga í tengslum við viðkomandi líftryggingarsamning eða til að framkvæma viðskipti með tiltekna gerninga í tengslum við viðkomandi líftryggingarsamning.

Að því er varðar a-lið þarf ekki að tilkynna um handveð eða svipaða veðsetningu fjármálagerninga í tengslum við að fjármálagerningar séu lagðir inn á vörslureikning, nema og þar til að slík handveð eða annað veð er tilgreint sem trygging tiltekinnar lánafyrirgreiðslu.

Að því marki sem vátryggingartaka ber að tilkynna um viðskipti samkvæmt þessari málsgrein lýtur vátryggingafélagið ekki tilkynningarskyldu.

8. Ákvæði 1. mgr. gilda um öll viðskipti eftir að heildarfjárhæðinni 5000 evrum er náð innan almanaksárs. Það hvort viðmiðunarfjárhæðinni, 5000 evrum, er náð skal reikna út með samlagningu, án útreiknings á hreinni stöðu, allra þeirra viðskipta sem um getur í 1. mgr.

9. Lögbært yfirvald getur ákveðið að hækka viðmiðunarmörkin sem sett eru fram í 8. mgr. upp í 20 000 evrur og skal upplýsa Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina um ákvörðun sína um að hækka viðmiðunarmörkin og rökstuðning hennar, með sérstakri tilvísun í markaðsaðstæður, áður en þeim er beitt. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal birta á vefsetri sínu lista yfir viðmiðunarmörk sem gilda í samræmi við þessa grein og þann rökstuðning sem lögbær yfirvöld leggja fram fyrir slíkum viðmiðunarmörkum.

10. Þessi grein gildir einnig um viðskipti einstaklinga sem gegna stjórnunarstörfum hjá uppboðsvettvangi, uppboðshaldara og uppboðsvaktara sem koma að uppboðum sem haldin eru samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010 og um einstaklinga sem eru nákomnir slíkum einstaklingum, að því marki sem viðskipti þeirra taka til losunarheimilda, afleiða þeirra eða uppboðsvara sem grundvallast á þeim. Þessir einstaklingar skulu tilkynna uppboðsvettvanginum, uppboðshaldaranum og uppboðsvaktaranum um viðskipti sín, eftir því sem við á, og lögbæra yfirvaldinu þar sem uppboðsvettvangurinn, uppboðshaldarinn eða uppboðsvaktarinn, eftir því sem við á, er skráður. Uppboðsvettvangarnir, uppboðshaldararnir, uppboðsvaktararnir eða lögbæra yfirvaldið skulu gera þær upplýsingar sem þannig er tilkynnt um opinberar í samræmi við 3. mgr.

11. Án þess að hafa áhrif á 14. og 15. gr. skal einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum hjá útgefanda ekki eiga viðskipti fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila, með beinum eða óbeinum hætti, í tengslum við hlutabréf eða skuldagerninga útgefandans eða afleiður eða aðra fjármálagerninga sem þeim tengjast á lokuðu 30 almanaksdaga tímabili áður en tilkynnt er um árshlutareikningsskil eða ársskýrslu sem útgefandanum er skylt að birta opinberlega í samræmi við:

a) reglur viðskiptavettvangsins þar sem hlutabréf útgefandans eru tekin til viðskipta eða

b) landslög.

12. Án þess að hafa áhrif á 14. og 15. gr. getur útgefandi heimilað einstaklingi sem gegnir stjórnunarstörfum hjá útgefandanum að eiga viðskipti fyrir eigin reikning eða fyrir reikning þriðja aðila á lokuðu tímabili eins og um getur í 11. mgr., annaðhvort:

a) vegna undantekningartilvika samkvæmt mati á hverju tilviki fyrir sig, s.s. alvarlegra fjárhagserfiðleika, sem krefjast tafarlausrar sölu hlutabréfa, eða

b) vegna eiginleika viðskipta sem fara fram samkvæmt, eða í tengslum við, áætlun um hlutabréfaeign eða sparnað starfsmanna, ávinnslu eða réttinda til hlutabréfa, eða viðskipta þar sem raunverulegir hagsmunir í viðkomandi verðbréfi breytast ekki.

13. Framkvæmdastjórninni skal falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. sem tilgreina við hvaða aðstæður útgefandinn getur heimilað viðskipti á lokuðu tímabili, eins og um getur í 12. mgr., þ.m.t. þær aðstæður sem myndu teljast undantekningartilvik og þær tegundir viðskipta sem myndu réttlæta heimild til viðskipta.

14. Framkvæmdastjórninni skal falið vald til að samþykkja framseldar gerðir í samræmi við 35. gr. sem tilgreina þær tegundir viðskipta sem myndu hrinda af stað kröfunum sem um getur í 1. mgr.

15. Til að tryggja samræmda beitingu 1. mgr. skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum um form og sniðmát sem skal nota við tilkynningu og opinbera birtingu þeirra upplýsinga sem um getur í 1. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdastaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

20. gr.

Fjárfestingarráðleggingar og tölfræðilegar upplýsingar

1. Aðilar sem semja eða dreifa ráðleggingum um fjárfestingar eða öðrum upplýsingum sem fela í sér ráðleggingu eða tillögu um fjárfestingaráætlun skulu gera eðlilegar ráðstafanir til að tryggja að slíkar upplýsingar séu settar fram á hlutlægan hátt og upplýsa um hagsmuni sína, eða tilgreina hagsmunaárekstra, í tengslum við þá fjármálagerninga sem þær upplýsingar varða.

2. Opinberar stofnanir sem dreifa tölfræðilegum upplýsingum eða spám sem líklegt er að hafi marktæk áhrif á fjármálamarkaði skulu dreifa þeim á hlutlægan og gagnsæjan hátt.

3. Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum til að ákvarða tæknilegt fyrirkomulag í tengslum við mismunandi flokka aðila sem um getur í 1. mgr., óhlutdræga framsetningu ráðlegginga um fjárfestingu og annarra upplýsinga sem fela í sér ráðleggingu eða tillögu um fjárfestingaráætlun og upplýsingagjöf um tiltekna hagsmuni eða tilgreiningu á hagsmunaárekstrum.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

Það tæknilega fyrirkomulag sem þeir tæknilegu eftirlitsstaðlar sem um getur í 3. mgr. mæla fyrir um gildir ekki um fréttamenn sem lúta jafngildu viðeigandi eftirliti í aðildarríki, þ.m.t. jafngildu viðeigandi sjálfseftirliti, að því tilskildu að slíkt eftirlit hafi sambærileg áhrif og það tæknilega fyrirkomulag. Aðildarríki skulu senda framkvæmdastjórninni texta reglna sinna um það jafngilda viðeigandi eftirlit.

21. gr.

Miðlun eða dreifing upplýsinga í fjölmiðlum

Að því er varðar 10. gr., 12. gr. (c-lið 1. mgr.) og 20. gr. skal miðlun eða dreifing upplýsinga, þegar upplýsingum er miðlað eða þeim dreift og ráðleggingar samdar eða þeim dreift til fréttaflutnings eða annarrar framsetningar í fjölmiðlum, vera metin með tilliti til þeirra reglna sem gilda um fjölmiðlafrelsi og tjáningarfrelsi í öðrum miðlum og til reglna og venja sem gilda um blaða- og fréttamennsku, nema:

a) hlutaðeigandi aðilar, eða aðilar nákomnir þeim, hafi, með beinum eða óbeinum hætti, ávinning eða hagnað af miðlun eða dreifingu viðkomandi upplýsinga, eða

b) tilgangur miðlunarinnar eða dreifingarinnar er að villa um fyrir markaðnum í tengslum við framboð á, eftirspurn eftir eða verð á fjármálagerningum.

4. KAFLI

EVRÓPSKA VERÐBRÉFAMARKAÐSEFTIRLITSSTOFNUNIN OG LÖGBÆR YFIRVÖLD

22. gr.

Lögbær yfirvöld

Án þess að hafa áhrif á valdsvið dómsmálayfirvalda tilnefnir hvert aðildarríki eitt lögbært yfirvald að því er varðar þessa reglugerð. Aðildarríki skulu upplýsa framkvæmdastjórnina, Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina og önnur lögbær yfirvöld í hinum aðildarríkjunum til samræmis við það. Lögbæra yfirvaldið skal tryggja að ákvæðum þessarar reglugerðar sé beitt á yfirráðasvæði þess, að því er varðar allar aðgerðir sem framkvæmdar eru á yfirráðasvæði þess og aðgerðir sem framkvæmdar eru erlendis í tengslum við gerninga sem eru teknir til viðskipta á skipulegum markaði, hafi verið óskað eftir töku þeirra til viðskipta á slíkum markaði, sem boðnir eru upp á uppboðsvettvangi eða sem viðskipti eru með á markaðstorgi fjármálagerninga eða skipulegum viðskiptavettvangi, eða sem óskað hefur verið eftir að teknir séu til viðskipta á markaðstorgi fjármálagerninga sem starfar á yfirráðasvæði þess.

23. gr.

Valdheimildir lögbærra yfirvalda

1. Lögbær yfirvöld skulu rækja hlutverk sitt og beita valdheimildum sínum með einhverjum af eftirfarandi hætti:

a) með beinum hætti,

b) í samstarfi við önnur yfirvöld eða markaðsfyrirtæki,

c) á eigin ábyrgð með framsali verkefna til slíkra yfirvalda eða markaðsfyrirtækja,

d) með því að leita til lögbærra dómsyfirvalda.

2. Svo þeim sé unnt að rækja skyldur sínar samkvæmt þessari reglugerð skulu lögbær yfirvöld, í samræmi við landslög, hafa a.m.k. eftirfarandi eftirlits- og rannsóknarheimildir:

a) að fá aðgang að öllum skjölum og gögnum á hvaða formi sem er og fá þau í hendur eða taka afrit af þeim,

b) að krefjast upplýsinga frá aðilum, þ.m.t. þeim sem koma á mismunandi tímum að því að senda fyrirmæli eða sinna viðkomandi starfsemi, sem og umbjóðendum þeirra, og, sé þörf á, kveðja slíkan aðila til fundar og spyrja hann spurninga í því skyni að fá upplýsingar,

c) í tengslum við hrávöruafleiður, að krefjast upplýsinga frá markaðsaðilum á tengdum stundarmörkuðum á stöðluðu formi, fá skýrslur um viðskipti og hafa beinan aðgang að kerfum miðlara,

d) að framkvæma vettvangsskoðanir og rannsóknir annars staðar en á einkaheimilum einstaklinga,

e) með fyrirvara um aðra undirgrein, að fara inn í húsnæði einstaklinga og lögaðila til að leggja hald á skjöl og gögn á hvaða formi sem er, sé rökstuddur grunur um að þau skjöl eða gögn sem tengjast viðfangsefni skoðunarinnar eða rannsóknarinnar kunni að skipta máli í að sýna fram á innherjasvik eða markaðsmisnotkun sem brýtur í bága við þessa reglugerð,

f) að vísa málum til rannsóknar sakamáls,

g) að krefjast þess að fá skráningar og upptökur símtala, rafrænna fjarskipta eða gagnaumferðarskrár sem eru í fórum verðbréfafyrirtækja, lánastofnana eða fjármálastofnana,

h) að krefjast, að því marki sem heimilt er samkvæmt landslögum, fyrirliggjandi gagnaumferðarskráa sem eru í fórum fjarskiptafyrirtækis, leiki rökstuddur grunur á broti og ef slíkar skrár geta skipt máli við rannsókn á broti á a- eða b-lið 14. gr. eða 15. gr.,

i) að krefjast frystingar eða upptöku eigna, eða hvoru tveggja,

j) að stöðva tímabundið viðskipti með viðkomandi fjármálagerning,

k) að krefjast tímabundinn stöðvunar á hvers konar framkvæmd sem lögbæra yfirvaldið telur brjóta í bága við ákvæði þessarar reglugerðar,

l) að leggja tímabundið bann við því að atvinnustarfsemi sé stunduð og

m) að gera allar nauðsynlegar ráðstafanir til að tryggja að almenningur fái réttar upplýsingar, m.a. með því að leiðrétta rangar eða villandi upplýsingar sem miðlað hefur verið, þ.m.t. með því að krefjast þess að útgefandi eða annar aðili sem hefur miðlað eða dreift röngum eða villandi upplýsingum birti yfirlýsingu til leiðréttingar.

Sé krafist, í samræmi við landslög, fyrirframleyfis dómsyfirvalda viðkomandi aðildarríkis til að fara inn í hús eða á lóð einstaklinga og lögaðila sem um getur í e-lið fyrstu undirgreinar skal aðeins beita þeim valdheimildum sem um getur í þeim lið að fengnu slíku fyrirframleyfi.

3. Aðildarríki skulu tryggja að viðeigandi ráðstafanir séu gerðar svo lögbær yfirvöld hafi allar nauðsynlegar eftirlits- og rannsóknarheimildir til að uppfylla skyldur sínar.

Þessi reglugerð hefur ekki áhrif á lög, reglugerðir eða stjórnsýslufyrirmæli sem samþykkt hafa verið í tengslum við yfirtökutilboð, samruna og önnur viðskipti sem hafa áhrif á eignarhald eða yfirráð fyrirtækja sem lúta eftirliti eftirlitsyfirvalda sem aðildarríki tilnefna skv. 4. gr. tilskipunar 2004/25/EB og sem gera kröfur til viðbótar við kröfur þessarar reglugerðar.

4. Aðili sem gerir upplýsingar aðgengilegar lögbæru yfirvaldi í samræmi við þessa reglugerð telst ekki brjóta gegn ákvæðum um takmörkun á miðlun upplýsinga sem mælt er fyrir um í samningi eða laga- eða stjórnsýsluákvæðum, og skal tilkynningaraðilinn ekki sæta ábyrgð af neinu tagi í tengslum við slíka tilkynningu.

24. gr.

Samstarf við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina

1. Lögbær yfirvöld skulu vinna með Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni að framkvæmd þessarar reglugerðar, í samræmi við reglugerð (ESB) nr. 1095/2010.

2. Lögbær yfirvöld skulu án tafar veita Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni allar nauðsynlegar upplýsingar svo henni sé kleift að uppfylla skyldur sínar, í samræmi við 35. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

3. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar á þessari grein skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að ákvarða verklag og eyðublöð til upplýsingaskipta eins og um getur í 2. mgr.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

25. gr.

Samstarfsskylda

1. Lögbær yfirvöld skulu starfa saman og með Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni ef nauðsyn krefur í tengslum við þessa reglugerð, nema ein af undanþágunum í 2. mgr. gildi. Lögbær yfirvöld skulu aðstoða lögbær yfirvöld annarra aðildarríkja og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina. Sér í lagi skulu þau skiptast á upplýsingum án ástæðulausrar tafar og vinna saman á sviði rannsókna, eftirlits og framfylgdar.

Skyldan til að starfa saman og veita aðstoð sem mælt er fyrir um í fyrstu undirgrein gildir einnig að því er varðar framkvæmdastjórnina í tengslum við upplýsingaskipti um hrávörur sem eru landbúnaðarafurðir og taldar upp í I. viðauka við sáttmálann um starfshætti Evrópusambandsins.

Lögbæru yfirvöldin og Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skulu starfa saman í samræmi við reglugerð (ESB) nr. 1095/2010, einkum 35. gr. hennar.

Hafi aðildarríki kosið, í samræmi við aðra undirgrein 1. mgr. 30. gr., að mæla fyrir um refsiviðurlög við brotum á ákvæðum þessarar reglugerðar sem um getur í þeirri grein skulu þau tryggja að viðeigandi ráðstafanir hafi verið gerðar svo lögbær yfirvöld hafi allar nauðsynlegar heimildir til samskipta við dómsyfirvöld innan lögsögu sinnar til að fá tilteknar upplýsingar í tengslum við rannsókn sakamála eða mál sem eru höfðuð vegna hugsanlegra brota á þessari reglugerð, og útvega öðrum lögbærum yfirvöldum og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni sömu upplýsingar til að uppfylla skuldbindingu sína um samstarf sín á milli og við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina að því er varðar þessa reglugerð.

2. Lögbæru yfirvaldi er eingöngu heimilt að synja beiðni um upplýsingar eða samstarf vegna rannsóknar í eftirfarandi undantekningartilvikum:

a) ef veiting viðkomandi upplýsinga gæti haft skaðleg áhrif á öryggi aðildarríkisins sem beiðninni er beint til, einkum baráttuna gegn hryðjuverkum og öðrum alvarlegum glæpum,

b) ef það að verða við beiðninni er líklegt til að hafa skaðleg áhrif á þess eigin rannsókn, framfylgd eða, eftir atvikum, rannsókn sakamáls,

c) ef dómsmál hefur þegar verið höfðað vegna sömu háttsemi gegn sömu aðilum fyrir yfirvöldum aðildarríkisins sem beiðninni er beint til eða

d) ef viðkomandi aðilar hafa hlotið endanlegan dóm fyrir sömu háttsemi í aðildarríkinu sem beiðninni er beint til.

3. Lögbærum yfirvöldum og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni ber að starfa með Samstarfsstofnun eftirlitsaðila á orkumarkaði (ACER), sem komið var fót samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 713/2009 ([1]), og landsbundnum eftirlitsyfirvöldum aðildarríkjanna til að tryggja samræmda nálgun við framfylgd viðkomandi reglna ef viðskipti, fyrirmæli um viðskipti eða aðrar aðgerðir eða hegðun tengist einum eða fleiri fjármálagerningum sem þessi reglugerð gildir um og einnig einum eða fleiri heildsöluorkuafurðum sem 3., 4. og 5. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1227/2011 gildir um. Lögbær yfirvöld skulu taka mið af hinum tilteknu eiginleikum skilgreininganna í 2. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1227/2011 og ákvæði 3., 4. og 5. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1227/2011 við beitingu 7., 8. og 12. gr. þessarar reglugerðar á fjármálagerninga sem tengjast heildsöluorkuafurðum.

4. Lögbær yfirvöld skulu, samkvæmt beiðni, tafarlaust veita hverjar þær upplýsingar sem nauðsynlegar eru í þeim tilgangi sem um getur í 1. mgr.

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 713/2009 frá 13. júlí 2009 um að koma á fót Samstarfsstofnun eftirlitsaðila á orkumarkaði (Stjtíð. ESB L 211, 14.8.2009, bls. 1).

5. Sé lögbært yfirvald sannfært um að brotið sé, eða brotið hafi verið, gegn ákvæðum þessarar reglugerðar á yfirráðasvæði annars aðildarríkis eða háttsemi hafi áhrif á fjármálagerninga sem viðskipti eru með á viðskiptavettvangi í öðru aðildarríki skal það tilkynna þetta til lögbærs yfirvalds hins aðildarríkisins og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar og, sé um að ræða heildsöluorkuafurðir, Samstarfsstofnunar eftirlitsaðila á orkumarkaði, á eins skilmerkilegan hátt og unnt er. Lögbær yfirvöld hlutaðeigandi aðildarríkja skulu hafa samráð hvert við annað og við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina og, í tengslum við heildsöluorkuafurðir, Samstarfsstofnun eftirlitsaðila á orkumarkaði um viðeigandi aðgerðir sem grípa skal til og upplýsa hvert annað um mikilvæga þætti í framvindu málsins í millitíðinni. Þau skulu samræma aðgerðir sínar til að komast hjá mögulegri tvítekningu og skörun við beitingu stjórnsýsluviðurlaga og annarra stjórnsýsluráðstafana í tilvikum sem ná yfir landamæri í samræmi við 30. og 31. gr. og aðstoða hvert annað við framfylgd ákvarðana sinna.

6. Lögbært yfirvald í einu aðildarríki getur óskað aðstoðar lögbærs yfirvalds annars aðildarríkis vegna vettvangsathugana eða rannsókna.

Lögbært yfirvald sem leggur fram beiðni getur upplýst Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina um hverja þá beiðni sem um getur í fyrstu undirgrein. Sé um að ræða rannsókn eða skoðun sem hefur áhrif yfir landamæri skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin hafa yfirumsjón til samræmingar með rannsókninni eða skoðuninni ef eitt lögbæru yfirvaldanna óskar eftir því.

Lögbæru yfirvaldi sem fær beiðni frá lögbæru yfirvaldi annars aðildarríkis um að gera vettvangsathugun eða rannsókn er heimilt að gera hvað sem er af eftirfarandi:

a) annast sjálft skoðunina á staðnum eða rannsóknina,

b) leyfa lögbæra yfirvaldinu, sem lagði fram beiðnina, að taka þátt í vettvangsathugun eða rannsókn,

c) leyfa lögbæra yfirvaldinu, sem lagði fram beiðnina, að framkvæma sjálft vettvangsathugunina eða rannsóknina,

d) skipa úttektaraðila eða sérfræðinga til að annast vettvangsathugunina eða rannsóknina,

e) deila tilteknum eftirlitstengdum verkefnum með öðrum lögbærum yfirvöldum.

Lögbær yfirvöld geta einnig haft samstarf við lögbær yfirvöld í öðrum aðildarríkjum til að auðvelda innheimtu fjárhagslegra viðurlaga.

7. Án þess að hafa áhrif á 258. gr. sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins er lögbæru yfirvaldi sem hefur ekki fengið viðbrögð við beiðni sinni um upplýsingar eða aðstoð í samræmi við 1., 3., 4. og 5. mgr. innan hæfilegs frests, eða fengið synjun á beiðni sinni um upplýsingar eða aðstoð, heimilt að vísa synjuninni eða aðgerðarleysinu innan hæfilegs frests til Evrópsku eftirlitsstofnunarinnar á verðbréfamarkaði.

Í slíkum tilvikum getur Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin aðhafst í samræmi við 19. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010, án þess að það hafi áhrif á möguleikann á því að hún aðhafist í samræmi við 17. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

8. Lögbær yfirvöld skulu starfa með og skiptast á upplýsingum við viðkomandi landsbundin eftirlitsyfirvöld og eftirlitsyfirvöld í þriðju löndum sem bera ábyrgð á tengdum stundarmörkuðum ef þau hafa rökstuddan grun um að háttsemi sem felur í sér innherjasvik, ólögmæta birtingu upplýsinga eða markaðsmisnotkun í bága við þessa reglugerð eigi sér eða hafi átt sér stað. Slíkt samstarf skal tryggja heildaryfirsýn á fjármála- og stundarmarkaði, að komið sé upp um misnotkun þvert á markaði og yfir landamæri og að viðurlögum sé beitt í slíkum tilvikum.

Í tengslum við losunarheimildir skal einnig tryggja það samstarf og upplýsingaskipti sem kveðið er á um í fyrstu undirgrein við:

a) uppboðsvaktarann, að því er varðar uppboð á losunarheimildum, eða öðrum uppboðsvörum sem grundvallast á þeim, sem eru haldin samkvæmt reglugerð (ESB) nr. 1031/2010, og

b) lögbær yfirvöld, skrárstjórnendur (e. *registry administrators*), þ.m.t. miðlæga stjórnandann (e. *Central Administrator*), og aðra opinbera aðila sem hafa með höndum eftirlit með hlítni samkvæmt tilskipun 2003/87/EB.

Hlutverk Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar skal vera að greiða fyrir og samræma samstarf og upplýsingaskipti milli lögbærra yfirvalda og eftirlitsyfirvalda í öðrum aðildarríkjum og þriðju löndum. Lögbær yfirvöld skulu, eftir því sem unnt er, gera samstarfssamninga við eftirlitsyfirvöld í þriðju löndum sem bera ábyrgð á tengdum stundarmörkuðum í samræmi við 26. gr.

9. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar á þessari grein skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að ákvarða verklag og eyðublöð til upplýsingaskipta og aðstoðar eins og um getur í þessari grein.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmda-stjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

26. gr.

Samstarf við þriðju lönd

1. Lögbær yfirvöld aðildarríkja skulu, ef nauðsyn krefur, gera samstarfssamninga við eftirlitsyfirvöld þriðju landa um upplýsingaskipti við eftirlitsyfirvöld þriðju landa og framfylgd skuldbindinga samkvæmt þessari reglugerð í þriðju löndum. Þessir samstarfssamningar skulu tryggja a.m.k. skilvirk upplýsingaskipti sem gera lögbæru yfirvöldunum kleift að sinna skyldum sínum samkvæmt þessari reglugerð.

Lögbært yfirvald skal gera Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni og hinum lögbæru yfirvöldunum viðvart ef það hyggst gera slíkan samning.

2. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal, þegar mögulegt er, greiða fyrir og samræma þróun samstarfssamninga milli lögbærra yfirvalda og viðkomandi eftirlitsyfirvalda þriðju landa.

Til að tryggja samræmda beitingu þessarar greinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum með sniðmáti fyrir samstarfssamninga sem lögbær yfirvöld í aðildarríkjunum skulu nota þegar unnt er.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum eftirlitsstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2015.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu eftirlitsstaðlana sem um getur í annarri undirgrein í samræmi við 10.–14. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal einnig, þegar unnt er, greiða fyrir og samræma skipti milli lögbærra yfirvalda á upplýsingum sem þau fá frá eftirlitsyfirvöldum þriðju landa og geta skipt máli fyrir ráðstafanir sem eru gerðar skv. 30. og 31. gr.

3. Lögbær yfirvöld skulu aðeins gera samstarfssamninga um upplýsingaskipti við eftirlitsyfirvöld þriðju landa ef um upplýsingarnar gildir þagnarskylda sem er að lágmarki jafngild þeirri sem kveðið er á um í 27. gr. Slík upplýsingaskipti verða að hafa þann tilgang að þjóna verkefnum viðkomandi lögbæru yfirvalda.

27. gr.

Þagnarskylda

1. Trúnaðarupplýsingar sem tekið er við, skipst er á eða sendar eru samkvæmt þessari reglugerð lúta þeim skilyrðum um þagnarskyldu sem mælt er fyrir um í 2. og 3. mgr.

2. Allar upplýsingar sem lögbær yfirvöld skiptast á samkvæmt þessari reglugerð og varða viðskipta- eða rekstrarskilyrði og önnur fjárhagsleg mál eða einkamál skulu teljast trúnaðarupplýsingar og lúta þagnarskyldu, nema lögbæra yfirvaldið lýsi því yfir þegar samskiptin fara fram að heimilt sé að miðla viðkomandi upplýsingum eða birting þeirra sé nauðsynleg vegna dómsmáls.

3. Þagnarskylda gildir um alla aðila sem vinna, eða hafa unnið, fyrir lögbæra yfirvaldið og hvert það yfirvald eða markaðsfyrirtæki sem lögbæra yfirvaldið hefur falið umboð sitt, þ.m.t. úttektaraðila og sérfræðinga sem lögbæra yfirvaldið semur við. Upplýsingum sem falla undir þagnarskyldu er óheimilt að miðla til annars aðila eða yfirvalds nema samkvæmt ákvæðum laga Sambandsins eða landslaga.

28. gr.

Persónuvernd

Að því er varðar vinnslu persónuupplýsinga innan ramma þessarar reglugerðar skulu lögbær yfirvöld sinna verkefnum sínum í tengslum við þessa reglugerð í samræmi við landslög, reglugerðir eða stjórnsýslufyrirmæli sem lögleiða tilskipun 95/46/EB. Að því er varðar vinnslu Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunarinnar á persónuupplýsingum innan ramma þessarar reglugerðar skal hún fara að ákvæðum reglugerðar (EB) nr. 45/2001.

Persónuupplýsingar skulu geymdar í fimm ár að hámarki.

29. gr.

Miðlun persónuupplýsinga til þriðju landa

1. Lögbærum yfirvöldum í aðildarríki er heimilt að senda persónuupplýsingar til þriðja lands að því tilskildu að kröfur tilskipunar 95/46/EB séu uppfylltar og aðeins háð mati í hverju tilviki fyrir sig. Lögbær yfirvöld skulu ganga úr skugga um að sendingin sé nauðsynleg að því er varðar þessa reglugerð og að þriðja landið sendi ekki upplýsingarnar til annars þriðja lands nema það fái til þess skýlausa skriflega heimild og uppfylli þau skilyrði sem lögbæra yfirvaldið í aðildarríkinu tilgreinir.

2. Lögbært yfirvald aðildarríkis skal aðeins miðla persónuupplýsingum sem berast frá lögbæru yfirvaldi í öðru aðildarríki til eftirlitsyfirvalds í þriðja landi þegar lögbæra yfirvaldið í viðkomandi aðildarríki hefur fengið skýlaust samþykki lögbæra yfirvaldsins sem sendi upplýsingarnar og, eftir atvikum, upplýsingunum aðeins miðlað í þeim tilgangi sem það lögbæra yfirvald veitti samþykki sitt fyrir.

3. Kveði samstarfssamningur á um skipti á persónuupplýsingum skal hann samræmast landslögum, reglum og stjórnsýslufyrirmælum sem lögleiða tilskipun 95/46/EB.

5. KAFLI

STJÓRNSÝSLURÁÐSTAFANIR OG -VIÐURLÖG

30. gr.

Stjórnsýsluviðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir

1. Án þess að hafa áhrif á refsiviðurlög og eftirlitsheimildir lögbærra yfirvalda skv. 23. gr. skulu aðildarríki, í samræmi við landslög, kveða á um að lögbær yfirvöld hafi vald til að beita viðeigandi stjórnsýsluviðurlögum og öðrum stjórnsýsluráðstöfunum í tengslum við a.m.k. eftirfarandi brot:

a) brot gegn 14. og 15. gr., 16. gr. (1. og 2. mgr.), 17. gr. (1., 2., 4., 5. og 8. mgr.), 18. gr. (1.–6. mgr.), 19. gr. (1., 2., 3., 5., 6., 7. og 11. mgr.), 20. gr. (1. mgr.) og

b) brest á því að samstarf sé haft eða farið sé að kröfum í rannsókn eða í tengslum við eftirlitsskoðun eða beiðni eins og um getur í 2. mgr. 23. gr.

Aðildarríki geta ákveðið að mæla ekki fyrir um reglur um stjórnsýsluviðurlög eins og um getur í fyrstu undirgrein ef brotin sem um getur í a- eða b-lið þeirrar undirgreinar falla þegar undir refsiviðurlög í landslögum þeirra hinn 3. júlí 2016. Taki aðildarríki slíka ákvörðun skal það gera framkvæmdastjórninni og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni ítarlega grein fyrir viðkomandi hlutum refsilöggjafar sinnar.

Aðildarríki skulu eigi síðar en 3. júlí 2016 gera framkvæmdastjórninni og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni ítarlega grein fyrir þeim reglum sem um getur í fyrstu og annarri undirgrein. Þau skulu án tafar tilkynna framkvæmdastjórninni og Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni um allar síðari breytingar á reglunum.

2. Aðildarríki skulu, í samræmi við landslög, tryggja að lögbær yfirvöld hafi vald til að beita a.m.k. eftirfarandi stjórnsýsluviðurlögum og að gera a.m.k. eftirfarandi stjórnsýsluráðstafanir vegna brots sem um getur í a-lið fyrstu undirgreinar 1. mgr.:

a) að gera hinum brotlega að láta af háttseminni og endurtaka hana ekki,

b) svipting ávinnings í formi hagnaðar af eða taps sem komist er hjá með brotinu, að því marki sem unnt er að ákvarða það,

c) opinber viðvörun sem tilgreinir hinn brotlega og eðli brotsins,

d) afturköllun eða tímabundin niðurfelling starfsleyfis verðbréfafyrirtækis,

e) tímabundið bann við því að einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum innan verðbréfafyrirtækis eða annar einstaklingur sem gerður er ábyrgur fyrir brotinu sinni stjórnunarstörfum hjá verðbréfafyrirtækjum,

f) sé um er að ræða endurtekin brot á 14. eða 15. gr., varanlegt bann við því að einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum innan verðbréfafyrirtækis eða annar einstaklingur sem gerður er ábyrgur fyrir brotinu sinni stjórnunarstörfum hjá verðbréfafyrirtækjum,

g) tímabundið bann við því að einstaklingur sem gegnir stjórnunarstörfum innan verðbréfafyrirtækis eða annar einstaklingur sem gerður er ábyrgur fyrir brotinu eigi viðskipti fyrir eigin reikning,

h) hámarki fjárhagslegra stjórnsýsluviðurlaga allt að þrefaldri fjárhæð hagnaðarins af brotinu, eða tapsins sem komist er hjá með því, sé unnt að ákvarða hana,

i) að því er varðar einstakling, hámarki fjárhagslegra stjórnsýsluviðurlaga sem nemur a.m.k.:

   i. vegna brota á 14. og 15. gr., 5 000 000 evrum eða, í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli viðkomandi ríkis hinn 2. júlí 2014,

   ii. vegna brota á 16. og 17. gr., 1 000 000 evrum eða, í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli viðkomandi ríkis hinn 2. júlí 2014, og

   iii. vegna brota á 18., 19. og 20. gr., 500 000 evrum eða, í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli viðkomandi ríkis hinn 2. júlí 2014, og

j) að því er varðar lögaðila, hámarki fjárhagslegra stjórnsýsluviðurlaga sem nemur a.m.k.:

i. vegna brota á 14. og 15. gr., 15 000 000 evrum eða 15% af heildarársveltu lögaðilans samkvæmt nýjustu fyrirliggjandi reikningsskilum sem samþykkt hafa verið af stjórninni, eða í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli þeirra hinn 2. júlí 2014,

ii. vegna brota á 16. og 17. gr., 2 500 000 evrum eða 2% af heildarársveltu þeirra samkvæmt nýjustu fyrirliggjandi reikningsskilum sem samþykkt hafa verið af stjórninni, eða í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli þeirra hinn 2. júlí 2014, og

iii. vegna brota á 18., 19. og 20. gr., 1 000 000 evrum eða, í aðildarríkjum sem ekki hafa evru sem gjaldmiðil, samsvarandi fjárhæð í gjaldmiðli þeirra hinn 2. júlí 2014.

Tilvísanir í lögbært yfirvald í þessari málsgrein hafa ekki áhrif á getu þess til að sinna hlutverki sínu með nokkrum þeim hætti sem um getur í 1. mgr. 23. gr.

Að því er varðar i. og ii. lið j-liðar fyrstu undirgreinar skal viðkomandi heildarársvelta, sé lögaðilinn móðurfélag eða dótturfyrirtæki sem ber að gera samstæðureikningsskil samkvæmt tilskipun 2013/34/ESB ([1]), vera heildarársvelta eða samsvarandi tegund tekna í samræmi við viðkomandi tilskipanir um reikningsskil – tilskipun ráðsins 86/635/EBE ([2]) fyrir banka og tilskipun ráðsins 91/674/EBE ([3]) fyrir vátryggingafélög – samkvæmt nýjustu fyrirliggjandi samstæðureikningsskilum sem stjórn endanlega móðurfélagsins hefur samþykkt.

3. Aðildarríki geta kveðið á um að lögbær yfirvöld hafi heimildir til viðbótar þeim sem um getur í 2. mgr. og kveðið á um strangari viðurlög en gert er í þeirri málsgrein.

31. gr.

Nýting eftirlitsheimilda og beiting viðurlaga

1. Aðildarríki skulu tryggja að lögbær yfirvöld taki tillit til allra aðstæðna sem máli skipta þegar þau taka ákvörðun um tegund og stig stjórnsýsluviðurlaga, þ.m.t., eftir því sem við á:

a) alvarleika og tímalengdar brotsins,

b) hve mikla ábyrgð hinn brotlegi ber á brotinu,

c) fjárhagslegs styrks hins brotlega, á grundvelli t.d. heildarveltu lögaðila eða árstekna einstaklings,

d) mikilvægis hagnaðar hins brotlega af brotinu eða taps sem hann kemst hjá með því, að því marki sem unnt er að ákvarða það,

e) samstarfsfýsi hins brotlega við lögbæra yfirvaldið, án þess að hafa áhrif á þörfina á að tryggja að hann endurgreiði hagnað sinn af brotinu eða tap sem hann komst hjá með því,

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2013/34/ESB frá 26. júní 2013 um árleg reikningsskil, samstæðureikningsskil og viðkomandi skýrslur tiltekinna tegunda fyrirtækja, um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2006/43/EB og niðurfellingu tilskipana ráðsins 78/660/EBE og 83/349/EBE (Stjtíð. ESB L 182, 29.6.2013, bls. 19).

([2]) Tilskipun ráðsins 86/635/EBE frá 8. desember 1986 um ársreikninga og samstæðureikninga banka og annarra fjármálastofnana (Stjtíð. EB L 372, 31.12.1986, bls. 1).

([3]) Tilskipun ráðsins 91/674/EBE frá 19. desember 1991 um ársreikninga og samstæðureikninga vátryggingafélaga (Stjtíð. EB L 374, 31.12.1991, bls. 7).

f) fyrri brota hins brotlega og

g) ráðstafana sem hinn brotlegi gerir til að koma í veg fyrir endurtekningu brotsins.

2. Við beitingu valdheimilda sinna til að beita stjórnsýsluviðurlögum og öðrum stjórnsýsluráðstöfunum skv. 30. gr. skulu lögbær yfirvöld vinna náið saman til að tryggja að beiting sín á eftirlits- og rannsóknarheimildum, stjórnsýsluviðurlögum og öðrum stjórnsýsluráðstöfunum sé skilvirk og viðeigandi samkvæmt þessari reglugerð. Þau skulu samræma aðgerðir sínar í samræmi við 25. gr. til að forðast tvíverknað og skörun við beitingu eftirlits- og rannsóknarheimilda sinna og stjórnsýsluviðurlaga í tilvikum sem ná yfir landamæri.

32. gr.

Tilkynningar um brot

1. Aðildarríki skulu tryggja að lögbær yfirvöld komi á skilvirkum kerfum til að gera kleift að tilkynna lögbærum yfirvöldum um raunveruleg eða möguleg brot á þessari reglugerð.

2. Kerfin sem um getur í 1. mgr. skulu a.m.k. fela í sér:

a) tiltekin ferli til móttöku tilkynninga um brot og eftirfylgni þeirra, þ.m.t. að komið sé á öruggum boðleiðum slíkra tilkynninga,

b) fullnægjandi vernd í starfi fyrir aðila sem starfa samkvæmt ráðningarsamningi og tilkynna um brot eða eru sakaðir um brot, gegn a.m.k. hefndaraðgerðum, mismunun eða annarri ósanngjarnri meðferð, og

c) vernd persónuupplýsinga bæði aðilans sem tilkynnir brotið og einstaklingsins sem sakaður er um brotið, þ.m.t. vernd í tengslum við að viðhalda nafnleynd þeirra, á öllum stigum málsmeðferðarinnar, með fyrirvara um upplýsingaskyldu samkvæmt landslögum í tengslum við rannsóknir eða dómsmál sem af hljótast.

3. Aðildarríki skulu krefjast þess að vinnuveitendur sem stunda starfsemi sem lýtur eftirliti sem fjármálaþjónusta hafi viðhlítandi innri ferla fyrir tilkynningar starfsmanna sinna um brot á þessari reglugerð.

4. Aðildarríki geta kveðið á um fjárhagslega hvata, sem veittir skulu í samræmi við landslög, fyrir aðila sem veita upplýsingar sem skipta máli um brot á þessari reglugerð, sé viðkomandi aðilum ekki þegar skylt að lögum eða samkvæmt samningi að tilkynna slíkar upplýsingar, og að því tilskildu að upplýsingarnar séu nýjar og leiði til beitingar stjórnsýslu- eða refsiviðurlaga eða annarra stjórnsýsluráðstafana vegna brots á þessari reglugerð.

5. Framkvæmdastjórnin skal samþykkja framkvæmdargerðir til að tilgreina þá ferla sem um getur í 1. mgr., þ.m.t. fyrirkomulag tilkynninga og eftirfylgniskýrslna, og ráðstafanir til verndar aðilum sem starfa samkvæmt ráðningarsamningi og til verndar persónuupplýsinga. Samþykkja skal þessar framkvæmdargerðir í samræmi við rannsóknarmálsmeðferðina sem um getur í 2. mgr. 36. gr.

33. gr.

Upplýsingaskipti við Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunina

1. Lögbær yfirvöld skulu árlega veita Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni heildarupplýsingar um öll stjórnsýsluviðurlög og aðrar stjórnsýsluráðstafanir sem lögbæra yfirvaldið beitir í samræmi við 30., 31. og 32. gr. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal birta þessar upplýsingar í árlegri skýrslu. Lögbær yfirvöld skulu einnig árlega veita Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni nafnlausar heildarupplýsingar um allar stjórnsýslurannsóknir sem gerðar eru í samræmi við þessar greinar.

2. Hafi aðildarríki, í samræmi við aðra undirgrein 1. mgr. 30. gr., mælt fyrir um refsiviðurlög við þeim brotum sem um getur í þeirri grein skulu lögbær yfirvöld þeirra árlega veita Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni nafnlausar heildarupplýsingar um allar rannsóknir sakamála sem ráðist er í og þau refsiviðurlög sem dómsyfirvöld beita í samræmi við 30., 31. og 32. gr. Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal birta upplýsingar um refsiviðurlög sem beitt er í árlegri skýrslu.

3. Hafi lögbært yfirvald upplýst um stjórnsýslu- eða refsiviðurlög eða aðrar stjórnsýsluráðstafanir opinberlega skal það samstundis gera Evrópsku verðbréfamarkaðseftirlitsstofnuninni viðvart.

4. Varði birt stjórnsýslu- eða refsiviðurlög eða aðrar stjórnsýsluráðstafanir verðbréfafyrirtæki sem hefur starfsleyfi í samræmi við tilskipun 2014/65/ESB skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin bæta tilvísun í hin birtu viðurlög eða ráðstöfun við skrána yfir verðbréfafyrirtæki sem gerð er skv. 3. mgr. 5. gr. þeirrar tilskipunar.

5. Til að tryggja samræmd skilyrði beitingar á þessari grein skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin semja drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum til að ákvarða verklag og eyðublöð til upplýsingaskipta eins og um getur í þessari grein.

Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin skal leggja þessi drög að tæknilegum framkvæmdarstöðlum fyrir framkvæmdastjórnina eigi síðar en 3. júlí 2016.

Framkvæmdastjórninni er veitt vald til að samþykkja tæknilegu framkvæmdarstaðlana sem um getur í fyrstu undirgrein í samræmi við 15. gr. reglugerðar (ESB) nr. 1095/2010.

34. gr.

Birting ákvarðana

1. Með fyrirvara um þriðju undirgrein skulu lögbær yfirvöld birta hverja ákvörðun um að beita stjórnsýsluviðurlögum eða öðrum stjórnsýsluráðstöfunum í tengslum við brot á þessari reglugerð á vefsetri sínu án tafar eftir að aðilinn sem lýtur viðkomandi ákvörðun er upplýstur um hana. Slík birting skal innihalda a.m.k. upplýsingar um tegund og eðli brotsins og deili á aðilanum sem fellur undir ákvörðunina.

Fyrsta undirgrein gildir ekki um ákvarðanir um að beita ráðstöfunum sem eru rannsóknarlegs eðlis.

Telji lögbært yfirvald að birting sem tilgreinir deili á lögaðila sem lýtur ákvörðuninni, eða birting á persónuupplýsingum einstaklings, sé óhófleg miðað við tilefnið að undangengnu meðalhófsmati í hverju tilviki fyrir sig á birtingu slíkra gagna, eða ef birtingin myndi tefla áframhaldandi rannsókn eða stöðugleika fjármálamarkaðarins í tvísýnu, skal það gera eitt af eftirfarandi:

a) fresta birtingu ákvörðunarinnar þar til ástæður frestunarinnar eru ekki lengur fyrir hendi,

b) birta ákvörðunina án nafngreiningar í samræmi við landslög ef slík birting tryggir haldgóða vernd viðkomandi persónuupplýsinga,

c) ekki birta ákvörðunina ef lögbæra yfirvaldið telur að birting í samræmi við a- eða b-lið dugi ekki til að tryggja:

   i. að stöðugleika fjármálamarkaða sé ekki teflt í tvísýnu eða

   ii. meðalhóf við birtingu slíkra ákvarðana sé um að ræða ráðstafanir sem teljast minniháttar.

Ákveði lögbært yfirvald að birta ákvörðun án nafngreiningar eins og um getur í b-lið þriðju undirgreinar getur það frestað birtingu viðkomandi gagna um hæfilegan tíma ef fyrirsjáanlegt er að ástæður birtingar án nafngreiningar verði ekki lengur fyrir hendi þegar sá tími rennur út.

2. Sé ákvörðuninni skotið til landsbundinna dómsyfirvalda, stjórnsýsluyfirvalds eða annars yfirvalds skulu lögbær yfirvöld án tafar einnig birta á vefsetri sínu slíkar upplýsingar og allar síðari upplýsingar um niðurstöðu þess málskots. Einnig skal birta allar ákvarðanir um ógildingu ákvörðunar sem skotið er til úrskurðar.

3. Lögbær yfirvöld skulu tryggja að hver ákvörðun sem er birt í samræmi við þessa grein sé áfram aðgengileg á vefsetri sínu í a.m.k. fimm ár eftir birtingu hennar. Persónuupplýsingar sem birtingin inniheldur skulu vera á vefsetri lögbæra yfirvaldsins svo lengi sem nauðsynlegt er samkvæmt viðeigandi reglum um persónuvernd.

6. KAFLI

FRAMSELDAR GERÐIR OG FRAMKVÆMDARGERÐIR

35. gr.

Beiting framsals

1. Framkvæmdastjórninni er falið vald til þess að samþykkja framseldar gerðir að uppfylltum þeim skilyrðum sem mælt er fyrir um í þessari grein.

2. Framkvæmdastjórninni skal falið vald til óákveðins tíma frá 2. júlí 2014 til að samþykkja framseldar gerðir sem um getur í 6. gr. (5. og 6. mgr.), 12. gr. (5. mgr.), 17. gr. (þriðja undirgrein 2. mgr.), 17. gr. (3. mgr.) og 19. gr. (13. og 14. mgr.).

3. Evrópuþinginu eða ráðinu er hvenær sem er heimilt að afturkalla framsal valds sem um getur í 6. gr. (5. og 6. mgr.), 12. gr. (5. mgr.), 17. gr. (þriðja undirgrein 2. mgr.), 17. gr. (3. mgr.) og 19. gr. (13. og 14. mgr.) Með ákvörðun um afturköllun skal bundinn endi á framsal þess valds sem tilgreint er í þeirri ákvörðun. Ákvörðunin öðlast gildi daginn eftir birtingu hennar í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins* eða síðar, eftir því sem tilgreint er í ákvörðuninni. Hún skal ekki hafa áhrif á gildi framseldra gerða sem þegar eru í gildi.

4. Um leið og framkvæmdastjórnin samþykkir framselda gerð skal hún tilkynna það Evrópuþinginu og ráðinu.

5. Framseld gerð sem er samþykkt skv. 6. gr. (5. og 6. mgr.), 12. gr. (5. mgr.), 17. gr. (þriðja undirgrein 2. mgr.), 17. gr. (3. mgr.) eða 19. gr. (13. eða 14. mgr.) skal því aðeins öðlast gildi að Evrópuþingið eða ráðið hafi ekki haft uppi nein andmæli innan þriggja mánaða frá tilkynningu um gerðina til Evrópuþingsins og ráðsins eða ef bæði Evrópuþingið og ráðið hafa upplýst framkvæmdastjórnina, áður en sá frestur er liðinn, um þá fyrirætlan sína að hreyfa ekki andmælum. Þessi frestur skal framlengdur um þrjá mánuði að frumkvæði Evrópuþingsins eða ráðsins.

36. gr.

Nefndarmeðferð

1. Framkvæmdastjórnin skal njóta aðstoðar evrópsku verðbréfanefndarinnar sem var stofnsett með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2001/528/EB ([1]). Sú nefnd skal vera nefnd í skilningi reglugerðar (ESB) nr. 182/2011.

2. Þegar vísað er til þessarar málsgreinar gilda ákvæði 5. gr. reglugerðar (ESB) nr. 182/2011.

([1]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2001/528/EB frá 6. júní 2001 um að koma á fót evrópsku verðbréfanefndinni (Stjtíð. EB L 191, 13.7.2001, bls. 45),

7. KAFLI

LOKAÁKVÆÐI

37. gr.

Niðurfelling á tilskipun 2003/6/EB og framkvæmdarráðstöfunum hennar

Tilskipun 2003/6/EB og tilskipanir framkvæmdastjórnarinnar 2004/72/EB ([1]), 2003/125/EB ([2]) og 2003/124/EB ([3]) og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2273/2003 ([4]) skulu felldar úr gildi frá og með 3. júlí 2016. Líta ber á tilvísanir í tilskipun 2003/6/EB sem tilvísanir í þessa reglugerð og lesa þær með hliðsjón af samsvörunartöflunni í II. viðauka þessarar reglugerðar.

38. gr.

Skýrsla

Framkvæmdastjórnin skal eigi síðar en 3. júlí 2019 leggja fyrir Evrópuþingið og ráðið skýrslu um beitingu þessarar reglugerðar ásamt tillögu að nýrri löggjöf til að breyta henni ef við á. Í skýrslunni skal m.a. lagt mat á:

a) hvort viðeigandi er að innleiða sameiginlegar reglur um þörfina á að öll aðildarríki kveði á um stjórnsýsluviðurlög við innherjasvikum og markaðsmisnotkun,

b) hvort skilgreiningin á innherjaupplýsingum nær til allra upplýsinga sem skipta máli fyrir skilvirka baráttu lögbærra yfirvalda gegn markaðssvikum,

c) hve viðeigandi skilyrðin eru fyrir því að banna viðskipti í samræmi við 11. mgr. 19. gr., með það fyrir augum að greina hvort bannið ætti einnig að gilda við fleiri aðstæður,

d) möguleikann á að setja ramma á vettvangi Sambandsins um eftirlit með tilboðaskrám þvert á markaði í tengslum við markaðssvik, þ.m.t. tillögur um slíkan ramma, og

e) gildissvið beitingar ákvæða um viðmiðunargildi.

Að því er varðar a-lið fyrstu undirgreinar skal Evrópska verðbréfamarkaðseftirlitsstofnunin kortleggja beitingu stjórnsýsluviðurlaga og, ef aðildarríki hafa ákveðið, samkvæmt annarri undirgrein 1. mgr. 30. gr., að mæla fyrir um refsiviðurlög eins og getið er um í því ákvæði vegna brota á þessari reglugerð, beitingu slíkra refsiviðurlaga innan aðildarríkja. Sú kortlagning skal einnig taka til allra gagna sem gerð eru aðgengileg skv. 1. og 2. mgr. 33. gr.

39. gr.

Gildistaka og beiting

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

([1]) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2004/72/EB frá 29. apríl 2004 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB að því er varðar viðurkenndar markaðsvenjur, skilgreiningu á innherjaupplýsingum í tengslum við afleidd vöruskuldaskjöl, samningu innherjaskráa, tilkynningu um viðskipti stjórnenda og tilkynningu um grunsamleg viðskipti (Stjtíð. ESB L 162, 30.4.2004, bls. 70).

([2]) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/125/EB frá 22. desember 2003 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB að því er varðar óhlutdræga kynningu ráðlegginga um fjárfestingu og birtingu upplýsinga um hagsmunaárekstra (Stjtíð. ESB L 339, 24.12.2003, bls. 73).

([3]) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/124/EB frá 22. desember 2003 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB að því er varðar skilgreiningu og birtingu á innherjaupplýsingum og skilgreiningu á markaðsmisnotkun (Stjtíð. ESB L 339, 24.12.2003, bls. 70).

([4]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2273/2003 frá 22. desember 2003 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/6/EB að því er varðar undanþágur fyrir endurkaupaáætlanir og verðjöfnun fjármálagerninga (Stjtíð. ESB L 336, 23.12.2003, bls. 33).

2. Hún gildir frá 3. júlí 2016 nema 4. gr. (4. og 5. mgr.), 5. gr. (6. mgr.), 6. gr. (5. og 6. mgr.), 7. gr. (5. mgr.), 11. gr. (9., 10. og 11. mgr.), 12. gr. (5. mgr.), 13. gr. (7. og 11. mgr.), 16. gr. (5. mgr.), 17. gr. (þriðja undirgrein 2. mgr.), 17. gr. (3., 10. og 11. mgr.), 18. gr. (9. mgr.), 19. gr. (13., 14. og 15. mgr.), 20. gr. (3. mgr.), 24. gr. (3. mgr.), 25. gr. (9. mgr.), 26. gr. (önnur, þriðja og fjórða undirgrein 2. mgr.), 32. gr. (5. mgr.) og 33. gr. (5. mgr.) sem taka gildi 2. júlí 2014.

3. Aðildarríki skulu gera viðeigandi ráðstafanir til að fara að 22., 23. og 30. gr., 31. gr. (1. mgr.) og 32. og 34. gr. fyrir 3. júlí 2016.

4. Tilvísanir í þessari reglugerð til tilskipunar 2014/65/ESB og reglugerðar (ESB) nr. 600/2014 skulu, fyrir 3. janúar 2017, lesnar sem tilvísanir í tilskipun 2004/39/EB í samræmi við samsvörunartöfluna sem sett er fram í IV. viðauka við tilskipun 2014/65/ESB, að því marki sem sú samsvörunartafla hefur að geyma ákvæði sem vísa til tilskipunar 2004/39/EB.

Þau ákvæði þessarar reglugerðar sem vísa til skipulegra viðskiptavettvanga, vaxtarmarkaða lítilla og meðalstórra fyrirtækja, losunarheimilda eða uppboðsvara sem grundvallast á þeim gilda ekki um skipulega viðskiptavettvanga, vaxtarmarkaði lítilla og meðalstórra fyrirtækja, losunarheimildir eða uppboðsvörur sem grundvallast á þeim fyrr en 3. janúar 2017.

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

Gjört í Strassborg 16. apríl 2014.

Fyrir hönd Evrópuþingsins,	*Fyrir hönd ráðsins,*
M. SCHULZ	D. KOURKOULAS
forseti.	*forseti.*

I. VIÐAUKI

A. **Vísbendingar um misnotkun með því að gefa ranga eða villandi mynd og tryggja óeðlilegt verð**

Að því er varðar beitingu a-liðar 1. mgr. 12. gr. þessarar reglugerðar, og án þess að hafa áhrif á þá hegðun sem um getur í 2. mgr. þeirrar greinar, skulu markaðsaðilar og lögbær yfirvöld sem rannsaka viðskipti eða viðskiptafyrirmæli taka tillit til eftirfarandi viðmiða, sem ekki eru tæmandi og skulu ein og sér ekki endilega teljast markaðsmisnotkun:

a) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli sem eru gefin eða viðskipti sem eiga sér stað eru verulegur hluti daglegs magns viðskipta með viðkomandi fjármálagerninga, tengda stundarsamninga um hrávörur eða uppboðsvörur sem grundvallast á losunarheimildum, einkum ef þetta atferli leiðir til verulegra breytinga á verði þeirra,

b) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli eða viðskipti aðila með verulega kaup- eða sölustöðu í fjármálagerningi, tengdum stundarsamningi um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum leiða til verulegra breytinga á verði þess fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum,

c) hvort viðskipti sem eiga sér stað valda engri breytingu á raunverulegu eignarhaldi fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum,

d) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli sem eru gefin eða viðskipti sem eiga sér stað, eða fyrirmæli sem eru afturkölluð, fela í sér að stöðutökum hefur verið snúið við á skömmum tíma sem nemur verulegum hluta daglegs viðskiptamagns með viðkomandi fjármálagerning, tengdan stundarsamning um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum og kunna að tengjast marktækum breytingum á verði fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum,

e) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli sem eru gefin eða viðskipti sem eiga sér stað eru samþjöppuð á stuttan tíma á viðskiptatímabilinu og leiða til verðbreytingar sem gengur síðan til baka,

f) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli sem eru gefin breyta upplýsingum um besta kaup- eða söluverð fjármálagernings, tengds stundarsamnings um hrávörur eða uppboðsvöru sem grundvallast á losunarheimildum eða, í víðara samhengi, upplýsingum í tilboðaskránni sem markaðsaðilar hafa aðgang að, og eru dregin til baka áður en þau eru afgreidd, og

g) að hvaða marki viðskiptafyrirmæli eru gefin eða viðskipti eiga sér stað á eða nálægt tilteknum tíma þegar viðmiðunarverð, uppgjörsverð og verðmat er reiknað út og leiða til verðbreytinga sem hafa áhrif á slíkt verð og verðmat.

B. **Vísbendingar um misnotkun með uppspuna eða öðrum blekkingum eða klækjum**

Að því er varðar beitingu b-liðar 1. mgr. 12. gr. þessarar reglugerðar, og án þess að hafa áhrif á þá hegðun sem um getur í 2. mgr. þeirrar greinar, skulu markaðsaðilar og lögbær yfirvöld sem rannsaka viðskipti eða viðskiptafyrirmæli taka tillit til eftirfarandi viðmiða, sem ekki eru tæmandi og skulu ein og sér ekki endilega teljast markaðsmisnotkun:

a) hvort áður en, eða eftir að, aðilar lögðu fram viðskiptafyrirmæli eða áttu í viðskiptum hafi þeir eða aðilar sem eru tengdir þeim dreift röngum eða villandi upplýsingum, og

b) hvort aðilar hafa lagt fram viðskiptafyrirmæli eða átt í viðskiptum áður en, eða eftir að, þeir sjálfir eða aðilar sem eru tengdir þeim semja eða dreifa ráðleggingum um fjárfestingar sem eru rangar eða hlutdrægar eða sem unnt er að sýna fram að verulegir hagsmunir hafi haft áhrif á.

———

II. VIÐAUKI

Samsvörunartafla

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
1. gr.	
2. gr.	
a-liður 1. mgr. 2. gr.	Fyrsta málsgrein 9. gr.
b-liður 1. mgr. 2. gr.	
c-liður 1. mgr. 2. gr.	
d-liður 1. mgr. 2. gr.	Önnur málsgrein 9. gr.
3. mgr. 2. gr.	Fyrsta málsgrein 9. gr.
4. mgr. 2. gr.	a-liður 10. gr.
1. liður 1. mgr. 3. gr.	3. mgr. 1. gr.
2. liður 1. mgr. 3. gr.	
3. liður 1. mgr. 3. gr.	
4. liður 1. mgr. 3. gr.	
5. liður 1. mgr. 3. gr.	
6. liður 1. mgr. 3. gr.	4. mgr. 1. gr.
7. liður 1. mgr. 3. gr.	
8. liður 1. mgr. 3. gr.	
9. liður 1. mgr. 3. gr.	5. mgr. 1. gr.
10. liður 1. mgr. 3. gr.	
11. liður 1. mgr. 3. gr.	
12. liður 1. mgr. 3. gr.	7. mgr. 1. gr.
13. liður 1. mgr. 3. gr.	6. mgr. 1. gr.
14.–35. liður 1. mgr. 3. gr.	
4. gr.	
5. gr.	8. gr.
1. mgr. 6. gr.	7. gr.
2. mgr. 6. gr.	
3. mgr. 6. gr.	
4. mgr. 6. gr.	
5. mgr. 6. gr.	
6. mgr. 6. gr.	
7. mgr. 6. gr.	

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
a-liður 1. mgr. 7. gr.	Fyrsta málsgrein 1. mgr. 1. gr.
b-liður 1. mgr. 7. gr.	Önnur málsgrein 1. mgr. 1. gr.
c-liður 1. mgr. 7. gr.	
d-liður 1. mgr. 7. gr.	Þriðja málsgrein 1. mgr. 1. gr.
2. mgr. 7. gr.	
3. mgr. 7. gr.	
4. mgr. 7. gr.	
5. mgr. 7. gr.	
1. mgr. 8. gr.	Fyrsta undirgrein 1. mgr. 2. gr.
2. mgr. 8. gr.	
a-liður 2. mgr. 8. gr.	b-liður 3. gr.
b-liður 2. mgr. 8. gr.	
3. mgr. 8. gr.	
a-liður 4. mgr. 8. gr.	a-liður 1. mgr. 2. gr.
b-liður 4. mgr. 8. gr.	b-liður 1. mgr. 2. gr.
c-liður 4. mgr. 8. gr.	c-liður 1. mgr. 2. gr.
d-liður 4. mgr. 8. gr.	d-liður 1. mgr. 2. gr.
Önnur undirgrein 4. mgr. 8. gr.	4. gr.
5. mgr. 8. gr.	2. mgr. 2. gr.
1. mgr. 9. gr.	
2. mgr. 9. gr.	
a-liður 3. mgr. 9. gr.	3. mgr. 2. gr.
b-liður 3. mgr. 9. gr.	3. mgr. 2. gr.
4. mgr. 9. gr.	
5. mgr. 9. gr.	
6. mgr. 9. gr.	
1. mgr. 10. gr.	a-liður 3. gr.
2. mgr. 10. gr.	
11. gr.	
1. mgr. 12. gr.	
a-liður 1. mgr. 12. gr.	a-liður 2. mgr. 1. gr.
b-liður 1. mgr. 12. gr.	b-liður 2. mgr. 1. gr.
c-liður 1. mgr. 12. gr.	c-liður 2. mgr. 1. gr.

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
d-liður 1. mgr. 12. gr.	
a-liður 2. mgr. 12. gr.	Fyrsti undirliður annarrar málsgreinar 2. mgr. 1. gr.
b-liður 2. mgr. 12. gr.	Annar undirliður annarrar málsgreinar 2. mgr. 1. gr.
c-liður 2. mgr. 12. gr.	
d-liður 2. mgr. 12. gr.	Þriðji undirliður annarrar málsgreinar 2. mgr. 1. gr.
e-liður 2. mgr. 12. gr.	
3. mgr. 12. gr.	
4. mgr. 12. gr.	
5. mgr. 12. gr.	Þriðja málsgrein 2. mgr. 1. gr.
1. mgr. 13. gr.	Önnur málsgrein a-liðar 2. mgr. 1. gr.
1. mgr. 13. gr.	
2. mgr. 13. gr.	
3. mgr. 13. gr.	
4. mgr. 13. gr.	
5. mgr. 13. gr.	
6. mgr. 13. gr.	
7. mgr. 13. gr.	
8. mgr. 13. gr.	
9. mgr. 13. gr.	
10. mgr. 13. gr.	
11. mgr. 13. gr.	
a-liður 14. gr.	Fyrsta málsgrein 1. mgr. 2. gr.
b-liður 14. gr.	b-liður 3. gr.
c-liður 14. gr.	a-liður 3. gr.
15. gr.	5. gr.
1. mgr. 16. gr.	6. mgr. 6. gr.
2. mgr. 16. gr.	9. mgr. 6. gr.
3. mgr. 16. gr.	
4. mgr. 16. gr.	
5. mgr. 16. gr.	Sjöundi undirliður 10. mgr. 6. gr.
1. mgr. 17. gr.	1. mgr. 6. gr.
Þriðja undirgrein 1. mgr. 17. gr.	Þriðja málsgrein 9. gr.
2. mgr. 17. gr.	

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
3. mgr. 17. gr.	
4. mgr. 17. gr.	2. mgr. 6. gr.
5. mgr. 17. gr.	
6. mgr. 17. gr.	
7. mgr. 17. gr.	
8. mgr. 17. gr.	Fyrsta og önnur undirgrein 3. mgr. 6. gr.
9. mgr. 17. gr.	
10. mgr. 17. gr.	Fyrsti og annar undirliður 10. mgr. 6. gr.
11. mgr. 17. gr.	
1. mgr. 18. gr.	Þriðja undirgrein 3. mgr. 6. gr.
2. mgr. 18. gr.	
3. mgr. 18. gr.	
4. mgr. 18. gr.	
5. mgr. 18. gr.	
6. mgr. 18. gr.	
7. mgr. 18. gr.	Þriðja málsgrein 9. gr.
8. mgr. 18. gr.	
9. mgr. 18. gr.	Fjórði undirliður 10. mgr. 6. gr.
1. mgr. 19. gr.	4. mgr. 6. gr.
a-liður 1. mgr. 19. gr.	4. mgr. 6. gr.
b-liður 1. mgr. 19. gr.	
2. mgr. 19. gr.	
3. mgr. 19. gr.	
a-liður 4. mgr. 19. gr.	
b-liður 4. mgr. 19. gr.	
5.–13. mgr. 19. gr.	
14. mgr. 19. gr.	Fimmti undirliður 10. mgr. 6. gr.
15. mgr. 19. gr.	Fimmti undirliður 10. mgr. 6. gr.
1. mgr. 20. gr.	5. mgr. 6. gr.
2. mgr. 20. gr.	8. mgr. 6. gr.
3. mgr. 20. gr.	Sjötti undirliður 10. mgr. 6. gr. og 11. mgr. 6. gr.
21. gr.	Annar málsliður c-liðar 2. mgr. 1. gr.
22. gr.	Fyrsta málsgrein 11. gr. og 10. gr.
1. mgr. 23. gr.	1. mgr. 12. gr.

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
a-liður 1. mgr. 23. gr.	a-liður 1. mgr. 12. gr.
b-liður 1. mgr. 23. gr.	b-liður 1. mgr. 12. gr.
c-liður 1. mgr. 23. gr.	c-liður 1. mgr. 12. gr.
d-liður 1. mgr. 23. gr.	d-liður 1. mgr. 12. gr.
a-liður 2. mgr. 23. gr.	a-liður 2. mgr. 12. gr.
b-liður 2. mgr. 23. gr.	b-liður 2. mgr. 12. gr.
c-liður 2. mgr. 23. gr.	
d-liður 2. mgr. 23. gr.	c-liður 2. mgr. 12. gr.
e-liður 2. mgr. 23. gr.	
f-liður 2. mgr. 23. gr.	
g-liður 2. mgr. 23. gr.	d-liður 2. mgr. 12. gr.
h-liður 2. mgr. 23. gr.	d-liður 2. mgr. 12. gr.
i-liður 2. mgr. 23. gr.	g-liður 2. mgr. 12. gr.
j-liður 2. mgr. 23. gr.	f-liður 2. mgr. 12. gr.
k-liður 2. mgr. 23. gr.	e-liður 2. mgr. 12. gr.
l-liður 2. mgr. 23. gr.	h-liður 2. mgr. 12. gr.
m-liður 2. mgr. 23. gr.	7. mgr. 6. gr.
3. mgr. 23. gr.	
4. mgr. 23. gr.	
1. mgr. 24. gr.	1. mgr. 15. gr. a
2. mgr. 24. gr.	2. mgr. 15. gr. a
3. mgr. 24. gr.	
Fyrsta undirgrein 1. mgr. 25. gr.	1. mgr. 16. gr.
2. mgr. 25. gr.	2. mgr. 16. gr. og fjórða undirgrein 4. mgr. 16. gr.
a-liður 2. mgr. 25. gr.	Fyrsti undirliður annarrar undirgreinar 2. mgr. 16. gr. og fjórða undirgrein 4. mgr. 16. gr.
b-liður 2. mgr. 25. gr.	
c-liður 2. mgr. 25. gr.	Annar undirliður annarrar undirgreinar 2. mgr. 16. gr. og fjórða undirgrein 4. mgr. 16. gr.
d-liður 2. mgr. 25. gr.	Þriðji undirliður annarrar undirgreinar 2. mgr. 16. gr. og fjórða undirgrein 4. mgr. 16. gr.
3. mgr. 25. gr.	
4. mgr. 25. gr.	Fyrsti málsliður 2. mgr. 16. gr.
5. mgr. 25. gr.	3. mgr. 16. gr.
6. mgr. 25. gr.	4. mgr. 16. gr.

Þessi reglugerð	Tilskipun 2003/6/EB
7. mgr. 25. gr.	Fjórða undirgrein 2. mgr. 16. gr. og fjórða undirgrein 4. mgr. 16. gr.
8. mgr. 25. gr.	
9. mgr. 25. gr.	5. mgr. 16. gr.
26. gr.	
1. mgr. 27. gr.	
2. mgr. 27. gr.	
3. mgr. 27. gr.	13. gr.
28. gr.	
29. gr.	
Fyrsta undirgrein 1. mgr. 30. gr.	1. mgr. 14. gr.
a-liður 1. mgr. 30. gr.	
b-liður 1. mgr. 30. gr.	3. mgr. 14. gr.
2. mgr. 30. gr.	
3. mgr. 30. gr.	
31. gr.	
32. gr.	
1. mgr. 33. gr.	Fyrsta undirgrein 5. mgr. 14. gr.
2. mgr. 33. gr.	
3. mgr. 33. gr.	Önnur undirgrein 5. mgr. 14. gr.
4. mgr. 33. gr.	Þriðja undirgrein 5. mgr. 14. gr.
5. mgr. 33. gr.	
1. mgr. 34. gr.	4. mgr. 14. gr.
2. mgr. 34. gr.	
3. mgr. 34. gr.	
35. gr.	
1. mgr. 36. gr.	1. mgr. 17. gr.
2. mgr. 36. gr.	
37. gr.	20. gr.
38. gr.	
39. gr.	21. gr.
Viðauki	

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2018/1832 **2020/EES/73/10**

frá 5. nóvember 2018

um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB, reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1151 í því skyni að bæta gerðarviðurkenningarprófanir og -aðferðir að því er varðar losun léttra farþega- og atvinnuökutækja, þ .m.t. prófanir og aðferðir vegna samræmis ökutækja í notkun og losunar þeirra í raunverulegum akstri og innleiðingu búnaðar til að vakta eldsneytis- og raforkunotkun. (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 715/2007 frá 20. júní 2007 um gerðarviðurkenningu vélknúinna ökutækja með tilliti til losunar frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 5 og Euro 6) og um aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald ökutækja ([1]), einkum 3. mgr. 5. gr. og 3. mgr. 14. gr.,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB frá 5. september 2007 um ramma um viðurkenningu á vélknúnum ökutækjum og eftirvögnum þeirra og á kerfum, íhlutum og aðskildum tæknieiningum sem ætlaðar eru í slík ökutæki (rammatilskipun) ([2]), einkum 2. mgr. 39. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Reglugerð (EB) nr. 715/2007 er eitt sérstakra stjórnvaldsfyrirmæla samkvæmt gerðarviðurkenningaraðferðinni sem mælt er fyrir um í tilskipun 2007/46/EB. Í henni er þess krafist að ný létt farþega- og atvinnuökutæki uppfylli tiltekin viðmiðunarmörk fyrir losun og mælt fyrir um frekari kröfur um aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald ökutækja. Þau sértæku, tæknilegu ákvæði sem nauðsynleg eru til að framkvæma ákvæði þeirrar reglugerðar er að finna í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1151 ([3]) sem kemur í stað fyrir og fellir úr gildi reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 ([4]).

2) Sum áhrifa reglugerðar framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 verða áfram til staðar þar til hún fellur niður frá og með 1. janúar 2022. Þó er nauðsynlegt að skýra að slík áhrif taka til möguleikans á því að óska eftir framlengingum á fyrirliggjandi gerðarviðurkenningum sem veittar hafa verið samkvæmt þessari reglugerð.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 301, 27.11.2018, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 289/2019 frá 13. desember 2019 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við *Stjórnartíðindi Evrópusambandsins* nr. 14, 5.3.2020, bls. 30.

([1]) Stjtíð. ESB L 171, 29.6.2007, bls. 1.

([2]) Stjtíð. ESB L 263, 9.10.2007, bls. 1.

([3]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1151 frá 1. júní 2017 um viðbætur við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 715/2007 um gerðarviðurkenningu vélknúinna ökutækja með tilliti til losunar frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 5 og Euro 6) og um aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald ökutækja, um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB, reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1230/2012 og um niðurfellingu á reglugerð (EB) nr. 692/2008 (Stjtíð. ESB L 175, 7.7.2017, bls. 1).

([4]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 frá 18. júlí 2008 um framkvæmd og breytingu reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 715/2007 um gerðarviðurkenningu vélknúinna ökutækja með tilliti til losunar frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 5 og Euro 6) og um aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald ökutækja (Stjtíð. ESB L 199, 28.7.2008, bls. 1).

3) Með reglugerð (ESB) 2017/1151 var ný lögbundin prófunaraðferð um framkvæmd prófunaraðferðar fyrir létt ökutæki sem samræmd er á heimsvísu (WLTP-prófunaraðferð) innleidd í löggjöf Sambandsins. WLTP-prófunaraðferðin inniheldur strangari og ítarlegri skilyrði um framkvæmd losunarprófana við gerðarviðurkenningu.

4) Að auki var með reglugerðum framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/427 ([1]), (ESB) 2016/646 ([2]) og (ESB) 2017/1154 ([3]) innleidd ný aðferðafræði við prófun á losun ökutækja í raunverulegum akstri, RDE-prófunaraðferðin.

5) Ákveðin vikmörk er nauðsynleg til að unnt sé að framkvæma WLTP-prófunina. Ekki skal þó misnota prófunarvikmörkin til að fá niðurstöður sem eru frábrugðnar þeim sem tengjast framkvæmd prófunarinnar við skilyrði sem notast við stillipunkta. Til að búa til jöfn samkeppnisskilyrði fyrir ólíka ökutækjaframleiðendur og til að tryggja að gildi fyrir mælda losun koltvísýrings og eldsneytisnotkun samræmist betur raunverulegum aðstæðum ætti því að innleiða aðferð til að staðla áhrif tiltekinna prófunarvikmarka á niðurstöður úr prófunum á koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun.

6) Eldsneytis- og/eða raforkunotkunargildunum sem fást með lögbundnu aðferðunum fyrir prófun á rannsóknarstofu skulu fylgja upplýsingar um meðalnotkun ökutækjanna í raunverulegum akstri á vegum. Slíkar upplýsingar, þegar þeim hefur verið safnað, þær gerðar nafnlausar og teknar saman, eru nauðsynlegar til að meta hvort lögbundnu prófunaraðferðirnar endurspegli með fullnægjandi hætti meðalkoltvísýringslosun við raunverulegar aðstæður, sem og eldsneytis- og/eða raforkunotkun. Þar að auki ætti tiltækileiki upplýsinga um augnablikseldsneytisnotkun að greiða fyrir prófun á vegum.

7) Til að tryggja tímanlegt mat á því hversu dæmigerðar nýju lögbundnu prófunaraðferðirnar eru, einkum fyrir ökutæki með mikla markaðshlutdeild, ætti í fyrstu að takmarka umfang nýju krafnanna um vöktun eldsneytisnotkunar um borð við hefðbundin ökutæki og tvinnökutæki sem ganga fyrir fljótandi eldsneyti og við tengitvinnrafökutæki, þar sem þau eru enn sem komið er einu ökutækin með aflrásir sem falla undir samsvarandi tæknistaðla.

8) Það magn sem notað er af eldsneyti og/eða raforku er þegar ákvarðað og vistað um borð í flestum nýjum ökutækjum, en hins vegar fellur búnaðurinn sem nú er notaður til að vakta þessar upplýsingar ekki undir staðlaðar kröfur. Til að tryggja að gögnin úr þessum búnaði séu aðgengileg og geti nýst sem samræmdur grunnur til samanburðar á mismunandi flokkum ökutækja og framleiðendum ætti að mæla fyrir um grunngerðarviðurkenningarkröfur að því er varðar þennan búnað.

9) Með reglugerð (ESB) 2016/646 var innleidd krafan um að framleiðendur tilgreini notkun aukalosunaraðferða. Að auki var eftirlit gerðarviðurkenningaryfirvalda með losunaraðferðum aukið með reglugerð (ESB) 2017/1154. Beiting þessara krafna hefur hins vegar undirstrikað þörfina á að samræma beitingu reglnanna um aukalosunaraðferðir af hálfu hinna ýmsu gerðarviðurkenningaryfirvalda. Þess vegna þykir rétt að mæla fyrir um sameiginlegt snið fyrir ítarlegu upplýsingamöppuna og sameiginlega aðferðafræði fyrir mat á aukalosunaraðferðum.

10) Ákvörðunin um að heimila aðgang, sé þess óskað, að ítarlegri upplýsingamöppu framleiðandans ætti að vera á höndum landsyfirvalda og því ætti að fella ákvæðið um upplýsingaleynd sem tengist þessu skjali brott úr reglugerð (ESB) 2017/1151. Þetta brottfall ætti ekki að hafa áhrif á samræmda beitingu löggjafarinnar í öllu Sambandinu, og ekki á möguleika allra aðila til að hafa aðgang að öllum viðeigandi upplýsingum til að framkvæma prófun á losun í raunverulegum akstri.

11) Eftir innleiðingu prófana á losun í raunverulegum akstri á gerðarviðurkenningarstiginu er nú nauðsynlegt að uppfæra reglurnar um sannprófun á samræmi ökutækja í notkun til að tryggja að losun í raunverulegum akstri sé einnig takmörkuð með skilvirkum hætti á eðlilegum endingartíma ökutækja miðað við venjuleg notkunarskilyrði.

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/427 frá 10. mars 2016 um breytingu á reglugerð (EB) nr. 692/2008 að því er varðar losun frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 6) (Stjtíð. ESB L 82 31.3.2016, bls. 1).

([2]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/646 frá 20. apríl 2016 um breytingu á reglugerð (EB) nr. 692/2008 að því er varðar losun frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 6) (Stjtíð. ESB L 109 26.4.2016, bls. 1).

([3]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1154 frá 7. júní 2017 um breytingu á reglugerð (ESB) 2017/1151 um viðbætur við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 715/2007 um gerðarviðurkenningu vélknúinna ökutækja með tilliti til losunar frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum (Euro 5 og Euro 6) og um aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald ökutækja, um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB, reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1230/2012 og niðurfellingu á reglugerð (EB) nr. 692/2008 og tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB að því er varðar losun frá léttum farþega- og atvinnuökutækjum í raunverulegum akstri (Euro 6) (Stjtíð. ESB L 175, 7.7.2017, bls. 708).

12) Beiting nýju prófananna á losun í raunverulegum akstri í sannprófun á samræmi ökutækja í notkun mun krefjast meiri tilfanga til að framkvæma sannprófun á samræmi ökutækis í notkun og meta niðurstöður hennar. Til að jafnvægi sé á milli þarfarinnar á að framkvæma skilvirka sannprófun á samræmi ökutækja í notkun og aukinnar prófunarbyrði ætti að aðlaga hámarksfjölda ökutækja í tölfræðilegu úrtaki og viðmiðanirnar um fullnægjandi og ófullnægjandi niðurstöður fyrir úrtakið sem gilda um alla sannprófun á samræmi ökutækja í notkun.

13) Sannprófun á samræmi ökutækja í notkun tekur sem stendur aðeins til losunar mengandi efna sem mæld er með prófun 1. Til að tryggja að kröfum í reglugerð (EB) nr. 715/2007 sé fullnægt ætti þó að rýmka hana svo hún nái yfir losun í gegnum útblástursrör og við uppgufun. Því ætti að innleiða prófanir 4 og 6 í sannprófunum á samræmi ökutækja í notkun. Þessar prófanir ættu þó að vera valkvæðar vegna þess hve kostnaðarsamar og flóknar þær eru.

14) Rýni framleiðenda á núverandi sannprófunum á samræmi ökutækja í notkun leiddi í ljós að afar fáar ófullnægjandi niðurstöður voru tilkynntar til viðurkenningaryfirvalda þó að framleiðendur hafi beitt innköllunarátökum og öðrum aðgerðum tengdum losun að eigin frumkvæði. Því er nauðsynlegt að innleiða meira gagnsæi og eftirlit í sannprófunum á samræmi ökutækja í notkun.

15) Til að hafa skilvirkara eftirlit með ferli sannprófana á samræmi ökutækja í notkun ættu gerðarviðurkenningaryfirvöld að vera ábyrg fyrir því að framkvæma prófanir og athuganir á hluta samþykktra ökutækja á hverju ári.

16) Til að greiða fyrir flæði þeirra upplýsinga sem verða til í sannprófunum á samræmi ökutækja í notkun, sem og aðstoða gerðarviðurkenningaryfirvöld í ákvarðanatökuferlinu, ætti framkvæmdastjórnin að þróa rafrænan vettvang.

17) Til að bæta valferlið fyrir ökutæki til prófunar af hálfu gerðarviðurkenningaryfirvalda er þörf á upplýsingum sem gætu greint hugsanleg vandamál og ökutækjagerðir með mikla losun. Viðurkenna ætti fjarskynjun, einfölduð losunarmælingarkerfi um borð (e. *simplified on-board emissions monitoring system* (SEMS)) og prófanir með færanlegum mælikerfum fyrir losun (PEMS) sem lögmæt tæki til að veita upplýsingar til gerðarviðurkenningaryfirvalda sem geta leiðbeint við val á ökutækjum til prófunar.

18) Afar mikilvægt er að tryggja gæði sannprófana á samræmi ökutækja í notkun. Því er nauðsynlegt að mæla fyrir um reglur um faggildingu prófunarstofa.

19) Til þess að prófanir geti farið fram þurfa allar viðeigandi upplýsingar að vera aðgengilegar almenningi. Að auki ætti hluti upplýsinganna sem nauðsynlegar eru við framkvæmd sannprófunar á samræmi ökutækja í notkun að vera aðgengilegar með auðveldum hætti og ættu því að vera tilgreindar í samræmisvottorðinu.

20) Til að auka gagnsæi í sannprófun á samræmi ökutækja í notkun ætti þess að vera krafist af gerðarviðurkenningaryfirvöldum að þau birti ársskýrslu með niðurstöðunum úr sannprófunum þeirra á samræmi ökutækja í notkun.

21) Sú aðferðafræði sem mælt var fyrir um til að tryggja að aðeins ferðir sem farnar eru við venjuleg skilyrði teljist gildar prófanir á losun í raunverulegum akstri leiddi til of margra ógildra prófana og því ætti að endurskoða og einfalda hana.

22) Endurskoðun á aðferðafræðinni við mat á losun mengandi efna í gildri ferð sýndi að niðurstöðurnar úr þeim tveim aðferðum sem leyfðar eru sem stendur eru ekki samrýmanlegar. Því ætti að mæla fyrir um nýja, einfalda og gagnsæja aðferðafræði. Matsþættirnir sem notaðir eru í nýju aðferðafræðinni ættu að vera í stöðugu mati hjá framkvæmdastjórninni til að endurspegla stöðu nýjustu tækni.

23) Taka ætti tilhlýðilegt tillit til notkunar tengitvinnrafökutækja, sem notuð eru að hluta í rafmagnsham og að hluta með sprengihreyflinum, að því er varðar prófun á losun í raunverulegum akstri og því ætti reiknaða losunin í raunverulegum akstri að endurspegla þá yfirburði.

24) Ný prófunaraðferð fyrir losun við uppgufun sem tekur tillit til tæknilegrar þróunar í stjórnun losunar við uppgufun frá ökutækjum knúnum bensíni, aðlagar þá aðferð að WLTP-prófunaraðferðinni og innleiðir ný ákvæði fyrir innsiglaða geyma hefur verið þróuð á vegum efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu (UN/ECE). Því er viðeigandi að uppfæra núverandi reglur Sambandsins um losun við uppgufun til að endurspegla breytingarnar hjá efnahagsnefnd Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu.

25) WLTP-prófunaraðferðin hefur einnig verið bætt enn frekar á vegum efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu og við hana bætt nokkrum nýjum þáttum, þ.m.t. öðrum leiðum til að mæla ökumótstöðu ökutækis, skýrari ákvæðum fyrir tvíeldsneytisökutæki, endurbætur á brúunaraðferðinni fyrir koltvísýring, uppfærslur tengdar kröfum fyrir tvíása aflmæla og snúningsmótstöðu hjólbarða. Þessa nýju þróun ætti nú að innleiða í löggjöf Sambandsins.

26) Fengin reynsla af beitingu WLTP-prófunaraðferðarinnar frá skyldubundinni innleiðingu hennar fyrir nýjar gerðir ökutækja í Sambandinu þann 1. september 2017 hefur sýnt fram á að aðlaga ætti þessa aðferð frekar að gerðarviðurkenningarkerfi Sambandsins, einkum að því er varðar upplýsingarnar sem fylgja skulu viðeigandi gögnum.

27) Breytingarnar á gerðarviðurkenningargögnunum sem verða með breytingunum í þessari reglugerð þurfa einnig að endurspeglast í samræmisvottorðinu og gerðarviðurkenningargögnunum fyrir fullbúið ökutæki í tilskipun 2007/46/EB.

28) Því er nauðsynlegt að breyta reglugerð (ESB) 2017/1151, reglugerð (ESB) nr. 692/2008 og tilskipun 2007/46/EB til samræmis við það.

29) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit tækninefndarinnar um vélknúin ökutæki.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2017/1151

Reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

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

a) Í stað b-liðar 1. liðar komi eftirfarandi:

„b) falla undir eitt „brúunarsvið fyrir koltvísýring“ í skilningi liðar 2.3.2 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka,“,

b) Í stað 6. liðar kemur eftirfarandi:

„6) „kerfi sem endurnýjar sig reglubundið“: mengunarvarnarbúnaður fyrir útblástur (t.d. hvarfakútur, agnasía) sem krefst þess að reglubundið endurnýjunarferli eigi sér stað,“,

c) Í stað 11. og 12. liðar kemur eftirfarandi:

„11) „tvíeldsneytisökutæki“ (e. *bi-fuel vehicle*): ökutæki sem er með tveimur aðskildum eldsneytisgeymslukerfum og er fyrst og fremst hannað til að ganga fyrir annarri eldsneytistegundinni í einu,

12) „tvíeldsneytisökutæki, knúið gasi“ (e. *bi-fuel gas vehicle*): tvíeldsneytisökutæki, þar sem eldsneytistegundirnar eru bensín og að auki annað hvort fljótandi jarðolíugas, jarðgas/lífmetan eða vetni,“,

d) Eftirfarandi liður 33 bætist við:

„33) „hreint brunahreyfilsökutæki“: ökutæki þar sem allir orkubreytar fyrir knúningsorku eru brunahreyflar,“,

e) Í stað 38. liðar kemur eftirfarandi:

„38) „málafl hreyfils“ (P_{rated}): hámarksnettóafl hreyfils í kW, mælt í samræmi við kröfurnar í XX. viðauka,“,

f) Í stað 45. til 48. liðar kemur eftirfarandi:

„45) „eldsneytisgeymiskerfi“: búnaður sem gerir kleift að geyma eldsneyti og sem samanstendur af eldsneytisgeymi, eldsneytisáfyllingarstút, loki á eldsneytisgeymi og eldsneytisdælunni þegar hún er sett upp í eða á eldsneytisgeyminum,

46) „gegndræpistuðull“: stuðullinn sem ákvarðaður er á grundvelli taps á vetniskolefnum á ákveðnu tímabili og notaður er til að ákvarða endanlega losun við uppgufun,

47) „einlaga málmlaus geymir“: eldsneytisgeymir sem er gerður úr einu lagi málmlauss efnis, þ.m.t. flúoruðum/súlfónuðum efnum,

48) „marglaga geymir“: eldsneytisgeymir sem er gerður úr a.m.k. tveimur mismunandi, lagskiptum efnum þar sem annað þeirra er tálmi gegn vetniskolefnum,“,

2) Ákvæðum 3. gr. er breytt sem hér segir:

1) Í stað 1. mgr. kemur eftirfarandi:

„1. Til að fá EB-gerðarviðurkenningu að því er varðar losun og upplýsingar um viðgerðir og viðhald ökutækja skal framleiðandinn sýna fram á að ökutækin séu í samræmi við kröfurnar í þessari reglugerð þegar þau eru prófið í samræmi við prófunaraðferðirnar sem tilgreindar eru í III. viðauka A til VIII. viðauka, XI., XIV., XVI., XX., XXI. og XXII viðauka. Framleiðandinn skal einnig sjá til þess að viðmiðunareldsneytin séu í samræmi við forskriftirnar sem settar eru fram í IX. viðauka.“

2) Í stað 7. mgr. kemur eftirfarandi:

„7. Að því er varðar prófun 1, sem lýst er í XXI. viðauka, skal prófa ökutæki sem eru knúin með fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani með prófun 1 með tilliti til breytileika í samsetningu fljótandi jarðolíugass eða jarðgass/lífmetans, eins og lýst er í 12. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 fyrir losun mengandi efna, með eldsneytinu sem notað er í mælingu á nettóafli í samræmi við XX. viðauka þessarar reglugerðar.

Ökutæki, sem geta notað annaðhvort bensín eða fljótandi jarðolíugas eða jarðgas/lífmetan, skulu prófuð með báðum tegundum eldsneytis og skulu prófanir á jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani gerðar með tilliti til breytileika í samsetningu fljótandi jarðolíugass eða jarðgass/lífmetans, eins og lýst er í 12. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, og með eldsneytinu sem notað er í mælingu á nettóafli í samræmi við XX. viðauka þessarar reglugerðar.“

3) Eftirfarandi 4. gr. a bætist við:

„4. gr. a

Kröfur varðandi gerðarviðurkenningu að því er varðar búnað til að vakta eldsneytis- og/eða raforkunotkun

Framleiðandi skal tryggja að eftirfarandi ökutæki í flokkum M1 og N1 séu útbúin með búnaði til að ákvarða, geyma og gera aðgengileg gögn um magn eldsneytis og/eða raforku sem notuð er við starfrækslu ökutækisins:

1) hrein brunahreyfilsökutæki og tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu (NOVC-HEV) og eru einungis knúin með jarðefnadísilolíu, lífdísilolíu, bensíni, etanóli eða með samsetningum af þessu eldsneyti,

2) Tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu (OVC-HEV) og eru knúin með rafmagni og einhverju því eldsneyti sem er tilgreint í 1. lið.

Búnaðurinn til að vakta eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun skal uppfylla kröfurnar sem mælt er fyrir um í XXII. viðauka.“

4) Ákvæðum 5. gr. er breytt sem hér segir:

a) Ákvæðum 11. mgr. er breytt sem hér segir:

a) Í stað annarrar undirgreinar komi eftirfarandi:

„Viðurkenningaryfirvaldið skal merkja og dagsetja ítarlegu upplýsingamöppuna og varðveita hana í a.m.k. tíu ár eftir að leyfið er veitt.“

b) Eftirfarandi þriðja til sjötta undirgrein bætast við:

„Að beiðni framleiðandans skal viðurkenningaryfirvaldið gera forkönnun á aukalosunaraðferðinni fyrir nýjar gerðir ökutækja. Í því tilviki skal leggja fram viðeigandi gögn til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins tveimur til tólf mánuðum áður en gerðarviðurkenningarferlið hefst.

Viðurkenningaryfirvaldið skal gera forkönnun á grundvelli ítarlegu upplýsingamöppunnar, sem framleiðandinn leggur fram, eins og lýst er í b-lið í 3. viðbæti a við I. viðauka. Viðurkenningaryfirvaldið skal framkvæma matið í samræmi við aðferðafræðina sem lýst er í 3. viðbæti b við I. viðauka. Viðurkenningaryfirvaldið getur brugðið frá þeirri aðferðafræði í sérstökum undantekningartilvikum og í tilhlýðilega rökstuddum tilvikum.

Forkönnunin á aukalosunaraðferðinni varðandi nýjar gerðir ökutækja skal halda gildi sínu í 18 mánuði að því er varðar gerðarviðurkenningu. Framlengja má það tímabil um 12 mánuði í viðbót ef framleiðandinn lætur viðurkenningaryfirvaldinu í té sönnun fyrir því að engin ný tækni sem myndi breyta forkönnuninni á aukalosunaraðferðinni hafi orðið aðgengileg á markaðnum.

Á hverju ári skal sérfræðingahópur gerðarviðurkenningaryfirvalda (TAAEG) taka saman skrá yfir aukalosunar-aðferðir sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið hefur talið óásættanlegar og framkvæmdastjórnin skal gera hana aðgengilega almenningi.“

b) Eftirfarandi 12. mgr. bætist við:

„12. Framleiðandinn skal einnig láta gerðarviðurkenningaryfirvaldinu, sem veitir gerðarviðurkenninguna sem tengist losun samkvæmt þessari reglugerð (hér á eftir nefnt „viðurkenningaryfirvaldið sem ber ábyrgð á veitingu gerðarviðurkenningar“), í té möppu um gagnsæi prófunar sem inniheldur nauðsynlegar upplýsingar til að hægt sé að framkvæma prófun í samræmi við lið 5.9 í B-hluta II. viðauka.“

5) Ákvæðum 9. gr. er breytt sem hér segir:

a) í stað 2. til 6. mgr. kemur eftirfarandi:

„2. Athuganir á samræmi ökutækja í notkun skulu henta til að staðfesta að losun gegnum útblástursrör og losun við uppgufun sé takmörkuð með skilvirkum hætti á eðlilegum endingartíma ökutækja miðað við venjuleg notkunarskilyrði.

3. Athugun á samræmi ökutækja í notkun skal gerð á ökutækjum sem hefur verið rétt við haldið og notuð á tilhlýðilegan hátt, í samræmi við 1. viðbæti við II. viðauka, á milli 15 000 km eða sex mánaða, hvort sem á sér stað síðar, og 100 000 km eða 5 ára, hvort sem á sér stað fyrr. Athugun á samræmi ökutækja í notkun varðandi losun við uppgufun skal gerð á ökutækjum sem hefur verið rétt við haldið og notuð á tilhlýðilegan hátt, í samræmi við 1. viðbæti við II. viðauka, á milli 30 000 km eða 12 mánaða, hvort sem á sér stað síðar, og 100 000 km eða 5 ára, hvort sem á sér stað fyrr.

Kröfurnar um athuganir á samræmi ökutækja í notkun gilda þar til fimm árum eftir að síðasta samræmisvottorðið eða vottorðið um skráningarviðurkenningu er gefið út fyrir ökutæki í þeim hópi sem tengist samræmi ökutækja í notkun.

4. Athuganir á samræmi ökutækja í notkun skulu ekki vera skyldubundnar ef árleg sala á ökutækjum í hópnum sem tengist samræmi ökutækja í notkun er undir 5000 ökutækjum innan Sambandsins á næstliðnu ári. Varðandi slíka hópa skal framleiðandinn láta viðurkenningaryfirvaldinu í té skýrslu um ábyrgðar- og viðgerðarkröfur og bilanir í innbyggðu greiningarkerfi eins og fram kemur í lið 4.1 í II. viðauka. Slíka hópa sem tengjast samræmi ökutækja í notkun má samt velja til prófunar í samræmi við II. viðauka.

5. Framleiðandinn og gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenningu skulu framkvæma athuganir á samræmi ökutækja í notkun í samræmi við II. viðauka.

6. Viðurkenningaryfirvaldið sem ber ábyrgð á veitingu gerðarviðurkenningar skal, að loknu mati á samræmi, taka ákvörðun um hvort að hópur uppfyllir ekki ákvæðin um samræmi ökutækja í notkun og samþykkja áætlunina um ráðstafanir til úrbóta sem framleiðandinn leggur fram í samræmi við II. viðauka.“

b) Eftirfarandi 7. og 8. mgr. bætast við:

„7. Ef gerðarviðurkenningaryfirvald hefur komist að þeirri niðurstöðu að hópur sem tengist samræmi ökutækja í notkun standist ekki athugunina á samræmi ökutækja í notkun skal það tafarlaust tilkynna gerðarviðurkenningaryfirvaldinu, sem veitir viðurkenningu, um það í samræmi við 3. mgr. 30. gr. tilskipunar 2007/46/EB.

Í kjölfar þeirrar tilkynningar og með fyrirvara um ákvæðin í 6. mgr. 30. gr. tilskipunar 2007/46/EB skal viðurkenningaryfirvaldið sem ber ábyrgð á veitingu gerðarviðurkenninga upplýsa framleiðanda hóps sem tengist samræmi ökutækja í notkun um að hópurinn standist ekki athuganir á samræmi ökutækja í notkun og að fylgja skuli aðferðunum sem lýst er í 6. og 7. lið II. viðauka.

Hefja skal málsmeðferð í samræmi við 6. mgr. 30. gr. tilskipunar 2007/46/EB ef viðurkenningaryfirvaldið sem ber ábyrgð á veitingu gerðarviðurkenninga kemst að þeirri niðurstöðu að samkomulag náist ekki við gerðarviðurkenningaryfirvald sem hefur komist að þeirri niðurstöðu að hópur sem tengist samræmi ökutækja standist ekki athugunina á samræmi ökutækja í notkun.

8. Til viðbótar við 1. til 7. lið skal eftirfarandi gilda um gerð ökutækis sem er viðurkennt í samræmi við B-hluta II. viðauka:

a) Ökutæki sem lögð eru fram til fjölþrepa gerðarviðurkenningar eins og skilgreint er í 7. mgr. 3. gr. tilskipunar 2007/46/EB skulu athuguð varðandi samræmi ökutækja í notkun í samræmi við reglurnar um fjölþrepa gerðarviðurkenningar sem settar eru fram í lið 5.10.6 í B-hluta II. viðauka við þessa reglugerð.

b) Brynvarin ökutæki, líkvagnar og ökutæki með hjólastólaaðgengi eins og skilgreint er í liðum 5.2 og 5.5 í A-hluta II. viðauka við tilskipun 2007/46/EB, eftir því sem við á, skulu ekki falla undir ákvæði þessarar greinar. Öll önnur ökutæki til sérstakra skal nota eins og þau eru skilgreind í 5. lið A-hluta II. viðauka við tilskipun 2007/46/EB, skulu athuguð vegna samræmi ökutækja í notkun í samræmi við reglurnar um fjölþrepa gerðarviðurkenningar sem settar eru fram í B-hluta II. viðauka við þessa reglugerð.“

6) Ákvæðum 15. gr. er breytt sem hér segir:

a) Í stað annarrar undirgreinar 2. mgr. kemur eftirfarandi:

„Frá og með 1. september 2019, skulu landsyfirvöld synja, af ástæðum sem varða losun eða eldsneytisnotkun, um veitingu EB-gerðarviðurkenningar eða landsbundinnar gerðarviðurkenningar að því er varðar nýjar gerðir ökutækja sem uppfylla ekki ákvæði VI. viðauka. Þó er heimilt, að beiðni framleiðandans, að nota, fram að 31. ágúst 2019, prófunaraðferðina fyrir losun við uppgufun, sem sett er fram í 7. viðauka við reglugerð Sameinuðu þjóðanna nr. 83, eða prófunaraðferðina fyrir losun við uppgufun sem sett er fram í VI. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008, að því er varðar gerðarviðurkenningar samkvæmt þessari reglugerð.“

b) Eftirfarandi undirgrein bætist við í 3. mgr.:

„Að undanskildum ökutækjum sem eru viðurkennd í tengslum við losun við uppgufun samkvæmt þeirri málsmeðferð sem mælt er fyrir um í VI. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008 skulu landsyfirvöld, frá og með 1. september 2019, banna skráningu, sölu eða það að taka í notkun ný ökutæki sem uppfylla ekki VI. viðauka við þessa reglugerð.“

c) Í 4. mgr. fellur d- og e-liður brott.

d) Ákvæðum 5. mgr. er breytt sem hér segir:

i. Í stað b-liðar komi eftirfarandi:

„b) Að því er varðar WLTP-brúunarhóp sem uppfyllir reglurnar um rýmkun sem tilgreindar eru í lið 3.1.4 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008 skulu gerðarviðurkenningaryfirvöld samþykkja aðferðirnar sem framkvæmdar eru í samræmi við lið 3.13 í III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008 í þrjú ár eftir dagsetningarnar sem gefnar eru í 4. mgr. 10. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007, til að uppfylla kröfurnar í 1. viðbæti við 6. undirviðauka XXI. viðauka þessarar reglugerðar.“

ii. Eftirfarandi bætist við c-lið:

„Möguleikinn á að nota niðurstöður úr prófun úr aðferðum sem framkvæmdar eru og lokið við í samræmi við reglugerð (EB) nr. 692/2008 skal, að því er varðar þennan lið, einungis gilda um þau ökutæki í WLTP-brúunarhóp sem uppfylla reglurnar um rýmkun sem eru tilgreindar í lið 3.3.1 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008.“

e) Eftirfarandi 8. til 11. liður bætast við:

„8. Ákvæði B-hluta II. viðauka gilda um flokk M1, M2 og flokk N1, undirflokk I, á grundvelli gerða sem eru viðurkenndar frá 1. janúar 2019 og um flokk N1, undirflokk II og III, og flokk N2 á grundvelli gerða sem eru viðurkenndar frá 1. september 2019. Ákvæðin gilda einnig um öll ökutæki sem skráð eru frá 1. september 2019 í flokki M1, M2 og flokki N1, undirflokki I, og um öll ökutæki sem skráð eru frá 1. september 2020 í flokki N1, undirflokki II og III, og flokki N2. Ákvæði A-hluta II. viðauka gilda í öllum öðrum tilvikum.

9. Frá og með 1. janúar 2020 að því er varðar ökutæki í flokki M1, N1, undirflokki I, eins og um getur í 4. gr. a, og frá 1. janúar 2021 að því er varðar ökutæki í flokki N1, undirflokki II og III, eins og um getur í 4. gr. a, skulu landsyfirvöld synja, af ástæðum sem varða losun eða eldsneytisnotkun, um veitingu EB-gerðarviðurkenningar eða landsbundinnar gerðarviðurkenningar fyrir nýjar gerðir ökutækja sem uppfylla ekki kröfurnar sem mælt er fyrir um í 4. gr. a.

Frá og með 1. janúar 2021 að því er varðar ökutæki í flokki M1, N1, undirflokki I, eins og um getur í 4. gr. a, og frá 1. janúar 2022 að því er varðar ökutæki í flokki N1, undirflokki II og III, eins og um getur í 4. gr. a, skulu landsyfiryfirvöld banna að ný ökutæki séu skráð, seld eða tekin í notkun ef þau uppfylla ekki ákvæði þeirrar greinar.

10. Frá og með 1. september 2019 skulu landsyfirvöld banna að ný ökutæki séu skráð, seld eða tekin í notkun ef þau uppfylla ekki kröfurnar sem settar eru fram í IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB eins og henni var breytt með reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2018/1832 (*).

Varðandi öll ökutæki sem skráð eru milli 1. janúar og 31. ágúst 2019 samkvæmt nýjum gerðarviðurkenningum sem veittar eru á sama tímabili og ef upplýsingarnar sem taldar eru upp í IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB eins og henni var breytt með reglugerð (ESB) 2018/1832 eru enn ekki innifaldar í samræmisvottorðinu skal framleiðandinn gera þessar upplýsingar aðgengilegar án endurgjalds innan fimm virkra daga frá beiðni viðurkenndrar rannsóknarstofu eða tækniþjónustu vegna prófunar samkvæmt II. viðauka.

11. Kröfurnar í 4. gr a gilda ekki um gerðarviðurkenningar sem eru veittar smærri framleiðendum.

(*) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2018/1832 frá 5. nóvember 2018 um breytingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2007/46/EB, reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 692/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1151 í því skyni að bæta gerðarviðurkenningarprófanir og -aðferðir að því er varðar losun léttra farþega- og atvinnuökutækja, þ.m.t. prófanir og aðferðir vegna samræmis ökutækja í notkun og losunar þeirra í raunverulegum akstri og innleiðingu búnaðar til að vakta eldsneytis og raforkunotkun (Stjtíð. ESB L 301, 27.11.2018, bls. 1).“

7) Ákvæði 18. gr. a falla brott.

8) Ákvæðum I. viðauka er breytt eins og fram kemur í I. viðauka við þessa reglugerð.

9) Ákvæðum II. viðauka er breytt eins og fram kemur í II. viðauka við þessa reglugerð.

10) Ákvæðum III. viðauka A er breytt eins og fram kemur í III. viðauka við þessa reglugerð.

11) Í stað liðar 2.3 í V. viðauka kemur eftirfarandi:

„2.3. Nota skal þá ökumótstöðustuðla sem gilda fyrir láglosandi ökutæki (VL). Ef gildi fyrir láglosandi ökutæki (VL) liggur ekki fyrir skal notast við ökumótstöðu fyrir hálosandi ökutæki (VH). Láglosandi og hálosandi ökutæki eru skilgreind í lið 4.2.1.1.2 í 4. undirviðauka við XXI. viðauka. Að öðrum kosti getur framleiðandi valið að nota ökumótstöðu, sem hefur verið ákvörðuð í samræmi við ákvæði 7. viðbætis í 4. viðauka a við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, fyrir ökutæki sem tilheyrir brúunarhópnum.“

12) Í stað VI. viðauka kemur texti IV. viðauka við þessa reglugerð,

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

1) Táknið PN kemur í stað P táknsins fyrir spillistuðul í skýringartextanum í töflunni í lið 2.2.

2) Eftirfarandi kemur í stað liðar 3.10:

„3.10. Nota skal þá ökumótstöðustuðla sem gilda fyrir láglosandi ökutæki (VL). Ef gildi fyrir láglosandi ökutæki liggur ekki fyrir eða ef heildarökumótstaða ökutækis (hálosandi ökutækis) við 80 km/klst. er meiri en heildarökumótstaða láglosandi ökutækis við 80 km/klst. + 5%, skal notast við ökumótstöðu hálosandi ökutækis. Láglosandi og hálosandi ökutæki eru skilgreind í lið 4.2.1.1.2 í 4. undirviðauka við XXI. viðauka.“

14) Í stað liðar 3.3 í VIII. viðauka kemur eftirfarandi:

„3.3. Nota skal þá ökumótstöðustuðla sem gilda fyrir láglosandi ökutæki (VL). Ef gildi fyrir láglosandi ökutæki (VL) liggur ekki fyrir skal notast við ökumótstöðu fyrir hálosandi ökutæki (VH). Láglosandi og hálosandi ökutæki eru skilgreind í lið 4.2.1.1.2 í 4. undirviðauka við XXI. viðauka. Að öðrum kosti getur framleiðandi valið að nota ökumótstöðu, sem hefur verið ákvörðuð samkvæmt ákvæðum 7. viðbætis í 4. viðauka a við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, fyrir ökutæki sem tilheyrir brúunarhópnum. Í báðum tilvikum skal stilla aflmælinn til að líkja eftir notkun ökutækis á veginum við –7 °C. Unnt er að miða slíka stillingu við ákvörðun ökumótstöðusniðs við –7 °C. Að öðrum kosti er unnt að stilla ákvarða akstursmótstöðu þannig að fríhjólunartíminn styttist um 10%. Tækniþjónustan getur samþykkt aðrar aðferðir við ákvörðun akstursmótstöðu.“

15) Ákvæðum IX. viðauka er breytt eins og fram kemur í V. viðauka við þessa reglugerð.

16) Í stað XI. viðauka kemur texti VI. viðauka við þessa reglugerð.

17) Ákvæðum XII. viðauka er breytt eins og fram kemur í VII. viðauka við þessa reglugerð.

18) Í stað orðanna „ákvæði liða 2.3.1 og 2.3.5 í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 2017/1151“ koma eftirfarandi orð: „ákvæði liða 2.3.1 og 2.3.4 í I. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151“,

19) Í stað XVI. viðauka kemur texti VIII. viðauka við þessa reglugerð.

20) Ákvæðum XXI. viðauka er breytt eins og fram kemur í IX. viðauka við þessa reglugerð.

21) Við bætist XXII. viðauki, eins og hann er settur fram í X. viðauka við þessa reglugerð.

2. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 692/2008

Reglugerð (EB) nr. 692/2008 er breytt sem hér segir:

1) Í fyrstu undirgrein 16. gr. a í reglugerð (ESB) nr. 692/2008 bætist eftirfarandi d-liður við:

„(d) rýmkun gerðarviðurkenninga sem veittar eru samkvæmt þessari reglugerð þar til nýjar kröfur koma til framkvæmda varðandi ný ökutæki“,

2) Eftirfarandi liður 3.2.12.2.5.7 bætist við 3. viðbæti við 1. viðauka:

„3.2.12.2.5.7. Gegndræpistuðull ([1]): …“,

3) Í XII. viðauka fellur liður 4.4 brott.

3. gr.

Breytingar á tilskipun 2007/46/EB

Ákvæðum I., III., VIII., IX. og XI. viðauka við tilskipun 2007/46/EB er breytt eins og sett er fram í XI. viðauka við þessa reglugerð.

4. gr.

Gildistaka

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

Hún kemur til framkvæmda frá og með 1. janúar 2019.

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

Gjört í Brussel 5. nóvember 2018.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

I. VIÐAUKI

Ákvæðum I. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Eftirfarandi liður 1.1.3. bætist við:

„1.1.3. Að því er varðar fljótandi jarðolíugas eða jarðgas skal nota það eldsneyti sem framleiðandi velur fyrir mælingu á nettóafli í samræmi við XX. viðauka við þessa reglugerð. Tilgreina skal eldsneytið sem valið er í upplýsingaskjalinu sem sett er fram í 3. viðbæti við I. viðauka við þessa reglugerð.“

2) Í stað liða 2.3.1., 2.3.2. og 2.3.3. kemur eftirfarandi:

„2.3.1. Í sérhverju ökutæki með tölvustýrðum mengunarvarnarbúnaði skulu vera stillingar sem koma í veg fyrir breytingar, að undanskildum þeim sem framleiðandi heimilar. Framleiðandinn skal heimila breytingar ef þær eru nauðsynlegar vegna greiningar, þjónustu, skoðunar, ísetningar endurbótarhlutar eða viðgerðar ökutækis. Allir endurforritanlegir tölvukóðar eða rekstrarmæliþættir skulu varðir gegn því að átt sé við þá og veita vernd sem er a.m.k. sambærileg þeirri sem er tryggð með ákvæðunum í ISO-staðli 15031-7:2013. Allir kvörðunarminniskubbar, sem unnt er að fjarlægja, skulu huldir, þeir inniluktir í innsigluðum ílátum eða þeir varðir með rafrænum reikniritum og skulu óbreytanlegir nema með sérhæfðum verkfærum og aðferðum. Einungis þættir sem tengjast beint losunarkvörðun eða því að koma í veg fyrir þjófnað á ökutækjum skulu varðir með þessum hætti.

2.3.2. Eigi skal unnt að breyta tölvuforrituðum hreyfilrekstrarþáttum (t.d. lóðuðum eða huldum tölvuíhlutum eða innsigluðum (eða lóðuðum) umlykjum) nema með sérhæfðum verkfærum og aðferðum.

2.3.3. Að beiðni framleiðandans getur viðurkenningaryfirvaldið veitt undanþágu frá skilyrðunum í liðum 2.3.1 og 2.3.2 fyrir þau ökutæki sem ólíklegt er að þurfi að vernda. Þær viðmiðanir sem viðurkenningaryfirvaldið metur þegar það tekur undanþágubeiðnir til athugunar eru, meðal annars en takmarkast ekki við, núverandi framboð á aflaukandi kubbum, hvort ökutækið hafi mikla hámarksafkastagetu og áætlaða sölu ökutækisins.“

3) Eftirfarandi liðir 2.3.4, 2.3.5 og 2.3.6 bætast við:

„2.3.4. Framleiðendur sem nota forritanleg tölvukóðunarkerfi skulu gera nauðsynlegar ráðstafanir til að fyrirbyggja óleyfilega endurforritun. Slíkar ráðstafanir skulu m.a. felast í aðferðum sem auka vörn gegn óheimilum breytingum og ritvörn sem krefst þess að notuð sé tölva sem ekki er í ökutækinu og framleiðandinn rekur og sem sjálfstæðir rekstraraðilar skulu einnig hafa aðgang að í samræmi við verndarákvæðin í liðum 2.3.1 og 2.2 í XIV. viðauka. Viðurkenningaryfirvöld skulu samþykkja aðferðir sem veita nægilega vörn gegn fikti.

2.3.5. Þegar um er að ræða vélknúnar eldsneytisdælur í þrýstikveikjuhreyflum skulu framleiðendur gera viðunandi ráðstafana til að vernda hámarksstillingu eldsneytisinngjafar frá því að átt sé við hana á meðan ökutækið er í notkun.

2.3.6. Framleiðendur skulu á árangursríkan hátt fyrirbyggja endurforritun stöðu kílómetramælis í netkerfi ökutækis, í stýrieiningum aflrásar sem og í sendieiningu þráðlausra gangaskipta, ef við á. Í því skyni að vernda heilleika lesturs kílómetramælis skulu framleiðendur notast við kerfisbundnar aðferðir sem auka vörn gegn fikti, ásamt ritvörn. Viðurkenningaryfirvöld skulu samþykkja aðferðir sem veita nægilega vörn gegn fikti.“

4) Í stað liðar 2.4.1 kemur eftirfarandi:

„2.4.1. Mynd I.2.4 sýnir framkvæmd prófana fyrir gerðarviðurkenningu ökutækis. Sértækum prófunaraðferðum er lýst í II. viðauka, III. viðauka A, IV., V., VI., VII., VIII., XI., XVI., XX., XXI. og XXII. viðauka.

Mynd I.2.4

Beiting prófunarkrafna fyrir gerðarviðurkenningu og rýmkun

Ökutækjaflokkur	Ökutæki með hreyfil með rafkveikju, þ.m.t. fjölknúin ökutæki (1) (2)								Ökutæki með þjöppukveikjuhreyfil, þ.m.t. tvinnökutæki	Hrein rafökutæki	Vetnisknúin ökutæki með efnarafala
	Eineldsneytisökutæki				Tvíeldsneytisökutæki (3)			Fjölblöndueldsneyti (3)			
Viðmiðunareldsneyti	Bensín (E10)	Fljótandi jarðolíugas	Jarðgas/ lífmetan	Vetni (brunahreyfill)	Bensín (E10) Fljótandi jarðolíugas	Bensín (E10) Jarðgas/lífmetan	Bensín (E10) Vetni (brunahreyfill) (4)	Bensín (E10) Etanól (E85)	Dísilolía (B7)	—	Vetni (efnarafali)
Mengandi lofttegundir (Prófun 1)	Já	Já	Já	Já (4)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Agnamassi (Prófun 1)	Já	—	—	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Fjöldi agna	Já	—	—	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Mengandi lofttegundir, losun í raunverulegum akstri (RDE)(prófun 1A)	Já	Já	Já	Já (4)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Agnafjöldi, losun í raunverulegum akstri (prófun 1A) (5)	Já	—	—	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Prófun með leiðréttingu á umhverfishita (prófun við 14 °C)	Já	Já	Já	Já (4)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já	—	—
Losun í lausagangi (Prófun 2)	Já	Já	Já	—	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (báðar eldsneytistegundir)	Já (eingöngu bensín)	Já (báðar eldsneytistegundir)	—	—	—

Ökutækjaflokkur	Ökutæki með hreyfil með rafkveikju, þ.m.t. fjölknúin ökutæki (1) (2)								Ökutæki með þjöppukveikjuhreyfil, þ.m.t. tvinnökutæki	Hrein rafökutæki	Vetnisknúin ökutæki með efnarafala
	Eineldsneytisökutæki				Tvíeldsneytisökutæki (3)			Fjölblöndueldsneyti (3)			
Losun frá sveifarhúsi (Prófun 3)	Já	Já	Já	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	—	—	—
Losun við uppgufun (Prófun 4)	Já	—	—	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	—	—	—
Ending (Prófun 5)	Já	Já	Já	Já	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já	—	—
Losun við lágt hitastig (Prófun 6)	Já	—	—	—	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (eingöngu bensín)	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	—	—	—
Samræmi ökutækja í notkun	Já	Já	Já	Já	Já (eins og við gerðarviðu-rkenningu)	Já (eins og við gerðarviður-kenningu)	Já (eins og við gerðarviður-kenningu)	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	Já	—	—
Innbyggð greiningarkerfi	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	—	—
Koltvísýringslosun, eldsneytisnotkun, raforkunotkun og rafdrægni	Já	Já	Já	Já	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	Já (báðar eldsneytis-tegundir)	Já	Já	Já
Reykþéttni	—	—	—	—	—	—	—	—	Já	—	—
Hreyfilafl	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já	Já

(1) Tilteknar prófunaraðferðir fyrir vetnisökutæki og lífdísilknúin ökutæki sem knýja má með fjölblöndueldsneyti verða skilgreindar síðar.
(2) Takmarkanir sem varða massa og fjölda efnisagna sem og tilheyrandi mæliaðferðir gilda eingöngu um ökutæki sem hafa hreyfla með beinni innsprautun.
(3) Þegar tvíeldsneytisökutæki er sameinað ökutæki sem knýja má með fjölblöndueldsneyti gilda báðar prófunarkröfurnar.
(4) Aðeins skal ákvarða losun köfnunarefnisoxíða þegar ökutækið gengur fyrir vetni.
(5) Prófun á fjölda agna í losun í raunverulegum akstri nær einungis til ökutækja með skilgreiningu á Euro 6 viðmiðunarmörkum fyrir fjölda agna sem eru losaðar í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.“

5) Í stað liðar 3.1.1 kemur eftirfarandi:

„3.1.1. Rýmka skal gerðarviðurkenninguna svo hún nái til ökutækja ef þau eru í samræmi við viðmiðanir sem settar eru fram í 1. mgr. 2. gr. eða ef þau eru í samræmi við a- og c-lið 1. mgr. 2. gr. og uppfylla eftirfarandi viðmiðanir:

a) Koltvísýringslosun ökutækisins, sem er prófað, sem hlýst af 9. þrepi í töflu A7/1 í 7. undirviðauka við XXI. viðauka er minni en eða jafn mikil og koltvísýringslosunin sem fæst með línulegri brúun sem samsvarar orkuþörf í lotu hjá ökutækinu sem er prófað,

b) nýja brúunarsviðið fer ekki yfir hámarkssviðið sem sett er fram í lið 2.3.2.2 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka,

c) losun mengandi efna tekur tillit til þröskuldsgilda í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.“

6) Eftirfarandi liður 3.1.1.1 bætist við:

„3.1.1.1. Gerðarviðurkenningin skal ekki rýmkuð til að búa til brúunarhóp ef hún hefur einungis verið veitt í tengslum við hálosandi ökutæki.“

7) Í stað fyrstu málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina í lið 3.1.2 kemur eftirfarandi:

„Að því er varðar Ki-prófanir, sem eru gerðar skv. 1. viðbæti við 6. undirviðauka við XXI. viðauka (WLTP), skal rýmka gerðarviðurkenninguna svo hún nái til ökutækja sem uppfylla viðmiðanirnar, sem settar eru fram í lið 5.9 í XXI. viðauka.“

8) Í stað liðar 3.2, ásamt öllum undirliðum hans, kemur eftirfarandi:

„3.2. **Rýmkun vegna losunar við uppgufun (prófun 4)**

3.2.1. Í tengslum við prófanir sem gerðar eru í samræmi við 6. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 [nýja evrópska akstursloten í einn dag) eða viðaukann við reglugerð (ESB) nr. 2017/1221 (nýja evrópska akstursloten í tvo daga) skal rýmka gerðarviðurkenninguna til að ná til ökutækja sem búin eru mengunarvarnarkerfi fyrir losun við uppgufun sem uppfyllir eftirfarandi skilyrði:

3.2.1.1. Grundvallarreglan við mælingu á eldsneyti/lofti (t.d. einspunkta innsprautun) skal vera sú sama.

3.2.1.2. Lögun eldsneytisgeymisins er nákvæmlega eins og þá er efnið í eldsneytisgeyminum og í slöngunum fyrir fljótandi eldsneyti tæknilega jafngilt.

3.2.1.3. Ökutækið sem er lakast að því er varðar þvermál og lengd eldsneytisslöngu skal prófað. Tækniþjónustan sem ber ábyrgð á prófunum fyrir gerðarviðurkenningu ákveður hvort hægt sé að viðurkenna gufu-/vökvaskiljur sem ekki eru eins.

3.2.1.4. Frávik rúmmáls eldsneytisgeymisins er innan við ± 10%.

3.2.1.5. Stilling léttiloka eldsneytisgeymisins er sams konar.

3.2.1.6. Aðferðin við geymslu eldsneytisgufunnar er sams konar, þ.e. lögun skiljunnar og rúmmál, geymslumiðillinn, loftsían (ef hún er notuð til að takmarka losun uppgufunarefna), o.s.frv.

3.2.1.7. Aðferðin við útloftun á uppsafnaðri gufu er sams konar (t.d. loftstreymi, upphafspunktur eða rúmmál þess sem loftað er út í formeðhöndlunarlotunni).

3.2.1.8. Aðferðin við þéttingu og loftun eldsneytismælikerfisins er sams konar.

3.2.2. Í tengslum við prófanir sem gerðar eru í samræmi við VI. viðauka [WLTP-prófunaraðferð í tvo daga] skal gerðarviðurkenningin rýmkuð til að ná til ökutækja sem eru útbúin mengunarvarnarkerfi fyrir losun við uppgufun sem uppfyllir kröfurnar í lið 5.5.1 í VI. viðauka.

3.2.3. Gerðarviðurkenningin skal rýmkuð svo hún nái til ökutækja með:

3.2.3.1. mismunandi hreyfilstærð,

3.2.3.2. mismunandi hreyfilafl,

3.2.3.3. sjálfvirka og handvirka gírkassa,

3.2.3.4. tvíhjóla- og fjórhjóladrifi,

3.2.3.5. mismunandi yfirbyggingu og

3.2.3.6. mismunandi stærðir hjóla og hjólbarða.“

9) Í stað liðar 4.1.2 kemur eftirfarandi:

„4.1.2. Framleiðandi skal gera athugun á samræmi framleiðslu með prófunum á losun mengunarefna (gefin upp í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007), á koltvísýringslosun (ásamt mælingu á raforkunotkun og, eftir atvikum, vöktun á nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun) sem og á losun frá sveifarhúsi, losun við uppgufun og á innbyggða greiningarkerfinu í samræmi við prófunaraðferðirnar sem lýst er í V., VI., XI., XXI. og XXII. viðauka. Sannprófun skal því fela í sér prófun 1, 3, 4 og prófun á innbyggða greiningarkerfinu, eins og lýst er í lið 2.4.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið skal geyma skrá í minnst fimm ár yfir öll þau gögn sem tengjast niðurstöðum úr prófunum á samræmi framleiðslu og skal veita framkvæmdastjórninni aðgang að þeirri skrá sé þess óskað.

Sérstakar aðferðir í tengslum við samræmi framleiðslu eru settar fram í liðum 4.2 til 4.7 og í 1. og 2. viðbæti.“

10) Í stað liðar 4.1.3 kemur eftirfarandi:

„4.1.3. Að því er varðar athugun framleiðanda á samræmi framleiðslu merkir hugtakið „hópur“ framleiðslusamræmishópur í tengslum við prófun 1, þ.m.t. vöktun á nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun, og prófun 3, sem felur í sér þá rýmkun fyrir prófun 4 sem lýst er í lið 3.2, og í tengslum við prófanir á innbyggðu greiningarkerfi merkir það ökutækjahópinn með innbyggð greiningarkerfi með þeirri rýmkun sem lýst er í lið 3.4.“

11) Eftirfarandi liðir 4.1.3.1, 4.1.3.1.1 og 4.1.3.1.2 bætast við:

„4.1.3.1. Viðmiðanir fyrir framleiðslusamræmishópa

4.1.3.1.1. Í tengslum við ökutæki í flokki M og ökutæki í flokki N1, undirflokki I og II, skal framleiðslusamræmishópinn vera eins og brúunarhópurinn eins og honum er lýst í lið 5.6 í XXI. viðauka.

4.1.3.1.2. Varðandi ökutæki í flokki N1, undirflokki III, og í flokki N2, geta einungis ökutæki sem eru eins að því er varðar eftirfarandi eiginleika ökutækis/aflrásar/gírskiptingar verið hluti af sama framleiðslusamræmishópi:

a) Gerð brunahreyfils: tegund eldsneytis (eða tegundir ef um er að ræða ökutæki knúin fjölblöndueldsneyti eða tvíeldsneytisökutæki), brennsluferli, slagrými hreyfils, eiginleikar við fullt álag, hreyfiltækni og hleðslukerfi og einnig önnur undirkerfi eða eiginleikar hreyfils sem hafa umtalsverð áhrif á massalosun koltvísýrings við WLTP-skilyrði,

b) vinnslumáti allra íhluta í aflrásinni sem áhrif hafa á massalosun koltvísýrings,

c) gerð gírskiptingar (t.d. beinskipting, sjálfskipting eða samfelld, stiglaus skipting) og tegund gírskiptingar (t.d. málgildi snúningsvægis, fjöldi gíra, fjöldi tengsla, o.s.frv.),

d) fjöldi aflása.“

12) Í stað liðar 4.1.4 kemur eftirfarandi:

„4.1.4. Tíðni sannprófunar á vöru, sem framleiðandi framkvæmir, skal byggð á áhættumatsaðferð sem samræmist alþjóðlega staðlinum ISO 31000:2018 — *Risk Management — Principles and guidelines*, og fyrir a.m.k. prófun 1 skal lágmarkstíðni vera ein sannprófun fyrir hver 5000 ökutæki sem eru framleidd í hverjum framleiðslusamræmishópi eða einu sinni á ári, hvort sem ber fyrr að.“

13) Í stað þriðju málsgreinar í lið 4.1.5 kemur eftirfarandi:

„Ef viðurkenningaryfirvaldið telur úttektaraðferð framleiðanda ekki fullnægjandi skal tafarlaust framkvæma raunverulega prófun á raðsmíðuðum ökutækjum eins og lýst er í liðum 4.2 til 4.7.“

14) Í stað annars málsliðar fyrstu málsgreinar í lið 4.1.6 kemur eftirfarandi:

„Viðurkenningaryfirvaldið skal framkvæma þessar raunverulegu prófanir á losun og á innbyggða greiningarkerfinu á raðsmíðuðum ökutækjum eins og lýst er í liðum 4.2 til 4.7.“

15) Í stað liða 4.2.1 og 4.2.2 kemur eftirfarandi:

„4.2.1. Gera skal prófun 1 á raðsmíðuðum ökutækjum sem tilheyra réttilega framleiðslusamræmishópnum sem lýst er í lið 4.1.3.1. Prófunarniðurstöðurnar eru þau gildi sem fást eftir allar leiðréttingar samkvæmt þessari reglugerð. Viðmiðunarmörkin, sem skulu notuð til að athuga samræmi í tengslum við mengunarefni, eru sett fram í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007. Að því er varðar koltvísýringslosun skulu viðmiðunarmörkin vera gildið sem framleiðandinn ákvarðar fyrir valið ökutæki í samræmi við brúunaraðferðina sem sett er fram í 7. undirviðauka við XXI. viðauka. Viðurkenningaryfirvaldið skal sannreyna brúunarútreikninginn.

4.2.2. Úrtak þriggja ökutækja skal valið af handahófi úr framleiðslusamræmishópnum. Eftir að val viðurkenningaryfirvalds hefur farið fram skal framleiðandinn ekki gera neinar breytingar á þeim ökutækjum sem hafa verið valin.“

16) Liður 4.2.2.1 fellur brott.

17) Í stað annarrar og þriðju málsgreinar í lið 4.2.3 kemur eftirfarandi:

„4.2.3. Tölfræðiaðferðinni, sem notuð er við útreikning á prófunarviðmiðunum, er lýst í 1. viðbæti.

Framleiðsla framleiðslusamræmishóps telst ekki vera í samræmi við kröfur þegar ófullnægjandi niðurstaða (e. *fail decision*) fæst með tilliti til eins eða fleiri mengunarefna og koltvísýringsgilda, í samræmi við prófunarviðmiðanirnar í 1. viðbæti.

Framleiðsla framleiðslusamræmishóps telst vera í samræmi við kröfur þegar fullnægjandi niðurstaða (e. *pass decision*) fæst með tilliti til allra mengunarefna og koltvísýringsgilda í samræmi við prófunarviðmiðanir í 1. viðbæti.“

18) Í stað liðar 4.2.4 kemur eftirfarandi:

„4.2.4. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins má framkvæma prófanir á ökutæki í framleiðslusamræmishópnum, sem er ekið 15 000 km að hámarki, í því skyni að ákvarða mælda þróunarstuðla (EvC) fyrir mengunarefni/koltvísýring fyrir hvern framleiðslusamræmishóp. Framleiðandinn skal annast tilkeyrslu og skal hann ekki gera neinar breytingar á þessum ökutækjum.“

19) Í stað inngangshlutans í c-lið liðar 4.2.4.1 kemur eftirfarandi:

„c) önnur ökutæki í framleiðslusamræmishópnum skal ekki tilkeyra, en útblástur/raforkunotkun/koltvísýringur þeirra við núll km skal margfaldaður með þróunarstuðlinum fyrir ökutækið sem fyrst er tilkeyrt. Í því tilviki skal nota eftirfarandi gildi í tengslum við prófunina skv. 1. viðbæti:“,

20) Í stað liðar 4.4.3.3 kemur eftirfarandi:

„4.4.3.3. Gildið sem er ákvarðað í samræmi við lið 4.4.3.2 skal borið saman við gildið sem er ákvarðað í samræmi við lið 2.4 í 2. viðbæti.“

21) Ákvæðum 1. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) í stað 1. liðar komi eftirfarandi:

„1. Í þessum viðbæti er lýst þeirri aðferð sem nota skal til að sannprófa kröfur um samræmi framleiðslu í tengslum við prófun 1 að því er varðar mengunarefni/koltvísýring, þ.m.t. kröfur um samræmi í tengslum við hrein rafökutæki og tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu, og til að vakta nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun.“

b) í stað fyrstu málsgreinar 2. liðar komi eftirfarandi:

Mælingar á mengunarefnunum sem eru tilgreind í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007 og á koltvísýringslosun skulu framkvæmdar á a.m.k. þremur ökutækjum og skal smám saman auka mælingar þar til fullnægjandi eða ófullnægjandi niðurstaða fæst. Ákvarða skal nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun fyrir hverja *N*-prófun.“

c) Í stað textans á eftir inngangshlutanum í iii. lið 3. liðar

„$\mathrm{A} \times L - VAR/L \leq X_{tests} < \mathrm{A} \times L - ((N-3)/13) \times VAR/L$“

kemur eftirfarandi:

„$\mathrm{A} \times L - VAR/L \leq X_{tests} \leq \mathrm{A} \times L - ((N-3)/13) \times VAR/L$“.

d) Í stað textans á eftir inngangshlutanum í iii. lið 4. liðar

„$\mathrm{A} - VAR \leq X_{tests} < \mathrm{A} - ((N-3)/13) \times VAR$“

kemur eftirfarandi:

„$\mathrm{A} - VAR \leq X_{tests} \leq \mathrm{A} - ((N-3)/13) \times VAR$“.

e) Síðasta málsgrein í 4 lið fellur brott.

f) Eftirfarandi 5. liður bætist við:

„5. Varðandi ökutæki sem um getur í 4. gr. a skal nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og eða orkunotkun reiknuð út með eftirfarandi hætti:

$x_{i,OBFCM}$ = nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun ákvörðuð fyrir hverja staka prófun i í samræmi við jöfnurnar í lið 4.2 í XXII. viðauka.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið skal geyma skrá yfir ákvarðaða nákvæmni í hverjum prófuðum framleiðslusamræmishópi.“

22) Ákvæðum 2. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í lið 1.2, í stað orðanna „lið 1.1.2.3 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka“ koma eftirfarandi orð: „lið 1.2.3 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka“

b) Í lið 2.3, í stað orðanna „lið 4.1.1 í XXI. viðauka“ koma eftirfarandi orð: „lið 4.1.1 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka“

c) Í lið 2.4, í stað orðanna „lið 1.1.2.3 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka“ koma eftirfarandi orð: „lið 1.2.3 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka“,

23) Ákvæðum 3. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Eftirfarandi liðir 0.2.2.1 til 0.2.3.9 bætast við:

„0.2.2.1. Leyfð gildi breytna fyrir fjölþrepa gerðarviðurkenningu til að nota losunargildi grunnökutækisins (setja inn svið ef við á):

Endanlegur massi ökutækis sem er tilbúið til aksturs (í kg): …

Framhlið fyrir endanlegt ökutæki (í cm^2): …

Snúningsmótstaða (kg/t): …

Þversniðsflatarmál loftinnstreymis inn um rist að framan (í cm^2): …

0.2.3. Auðkenni:

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-hóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps

0.2.3.4.1. Ökumótstöðuhópur hálosandi ökutækis …

0.2.3.4.2. Ökumótstöðuhópur láglosandi ökutækis …

0.2.3.4.3. Ökumótstöðuhópar sem eiga við um brúunarhópinn: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps: …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps í prófun á losun við uppgufun: …

0.2.3.8. Auðkenni hóps með innbyggt greiningarkerfi: …

0.2.3.9. auðkenni annars hóps: …“,

b) Ákvæði b-liðar í lið 2.6 falla brott.

c) eftirfarandi liður 2.6.3. bætist við:

„2.6.3. Snúningsmassi: er 3% af summu massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs og 25 kg eða gildi á hverjum ás (kg): …“,

d) Í stað liðar 3.2.2.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.2.1. Dísilolía/bensín/fljótandi jarðolíugas/jarðgas eða lífmetan/etanól(E 85)/lífdísilolía/vetni ([1]), ([6])“,

e) Í stað liðar 3.2.12.2.5.5 kemur eftirfarandi:

„3.2.12.2.5.5. Teikning af eldsneytisgeyminum (eingöngu fyrir bensín- og etanólhreyfla): …“,

f) Eftirfarandi liðir 3.2.12.2.5.5.1 til 3.2.12.2.5.5.5 bætast við:

„3.2.12.2.5.5.1. Afkastageta, smíðaefni og smíði eldsneytisgeymiskerfis: …

3.2.12.2.5.5.2. Lýsing á efni sem slöngur fyrir gufu og eldsneytisleiðslur eru gerðar úr og á aðferðinni til að tengja eldsneytiskerfið: …

3.2.12.2.5.5.3. Þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi: já/nei

3.2.12.2.5.5.4. Lýsing á stillingu öryggisloka eldsneytisgeymis (inndæling lofts og þrýstingslækkun): …

3.2.12.2.5.5.5. Lýsing á eftirlitskerfi fyrir hreinsun: …“,

g) Í stað liðar 3.2.12.2.5.6 kemur eftirfarandi:

„3.2.12.2.5.6. Lýsing og uppdráttur af hitahlífinni milli geymis og útblásturskerfis: …“,

h) Eftirfarandi liður 3.2.12.2.5.7 bætist við:

„3.2.12.2.5.7. Gegndræpistuðull: …“,

i. Eftirfarandi liður 3.2.12.2.12 bætist við:

„3.2.12.2.12. Vatnsinnsprautun: já/nei (1)“,

j) Ákvæði liðar 3.2.19.4.1 falla brott,

k) Í stað liðar 3.2.20 kemur eftirfarandi:

„3.2.20. Upplýsingar um varmageymslu“,

l) Í stað liðar 3.2.20.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.20.2. Einangrunarefni: já/nei (1)“,

m) Eftirfarandi liðir 3.2.20.2.5, 3.2.20.2.5.1, 3.2.20.2.5.2, 3.2.20.2.5.3 og 3.2.20.2.6 bætast við:

„3.2.20.2.5. Verstu hugsanlegu tilfelli við kælingu ökutækis: já/nei (1)

3.2.20.2.5.1. (ekki verstu hugsanlegu tilfelli) Lágmarksvarmajafnvægistími, t_{soak_ATCT} (klukkustundir): …

3.2.20.2.5.2. (ekki verstu hugsanlegu tilfelli) Staðsetning hitamælingar hreyfils: …

3.2.20.2.6. Aðferð fyrir einn brúunarhóp innan ATCT-hópsins: já/nei (1)“,

n) eftirfarandi liður 3.3 bætist við:

„3.3. Rafvélar

3.3.1. Gerð (vindingar, mögnun): …

3.3.1.1. Hámarksafköst á klukkustund: … kW

(uppgefið gildi framleiðanda)

3.3.1.1.1. Hámarksnettóafl (a) … kW

(uppgefið gildi framleiðanda)

3.3.1.1.2. Hámarksafl á 30 mínútum (a) … kW

(uppgefið gildi framleiðanda)

3.3.1.2. Rekstrarspenna:… V

3.3.2. Endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi

3.3.2.1. Fjöldi rafgeymiseininga: …

3.3.2.2. Massi: … kg

3.3.2.3. Rýmd: … Ah (amperstundir)

3.3.2.4. Staða: …“,

o) Í stað liða 3.5.7.1 og 3.5.7.1.1 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.1. Mæliþættir fyrir prófunarökutækið

Ökutæki	Láglosandi ökutæki (VL) ef það er til staðar	Hálosandi ökutæki (VH)	Miðlosandi ökutæki (VM) ef það er til staðar	Dæmigert gildi V (eingöngu fyrir ökumótstöðu-fylkjahóp(*))	Sjálfgildi
Gerð yfirbyggingar ökutækis			—		
Aðferð sem notuð er til að mæla ökumótstöðu (mæling eða útreikningur miðað við ökumót-stöðuhóp)			—	—	

Ökutæki	Láglosandi ökutæki (VL) ef það er til staðar	Hálosandi ökutæki (VH)	Miðlosandi ökutæki (VM) ef það er til staðar	Dæmigert gildi V (eingöngu fyrir ökumótstöðu-fylkjahóp(*))	Sjálfgildi
Upplýsingar um ökumótstöðu:					
Tegund og gerð hjólbarða ef um mælingu er að ræða			—		
Hjólbarðastærð (framan/aftan) ef um mælingu er að ræða			—		
Snúningsmótstaða hjólbarða (framan/aftan) (kg/t)					
Þrýstingur í hjólbörðum (framan/aftan) (kPa), ef um mælingu er að ræða					
Delta $C_D \times A$ ökutækis L í samanburði við ökutæki H (IP_H að frádregnu IP_L)	—		—	—	
Delta $C_D \times A$ í samanburði við ökutæki L í ökumótstöðuhópi (IP_H/L að frádregnu RL_L) ef útreikningur miðast við ökumótstöðuhóp			—	—	
Prófunarmassi ökutækis (kg)					
Ökumótstöðustuðlar					
f_0 (N)					
f_1 (N/(km/klst.))					
f_2 (N/(km/klst.)^2)					
Framhlið, m^2 (0,000 m^2)	—	—	—		
Orkuþörf í lotu (J)					

(*) Dæmigert ökutæki er prófað í tengslum við ökumótstöðufylkjahópinn.

3.5.7.1.1. Eldsneyti notað við prófun 1 og valið vegna mælingarinnar á nettóaflinu í samræmi við XX. viðauka við þessa reglugerð (eingöngu ökutæki sem útbúin eru fyrir fljótandi jarðolíugas eða jarðgas): ..... “,

p) Liðir 3.5.7.1.1.1 til 3.5.7.1.3.2.3 falla brott,

q) Í stað liða 3.5.7.2.1 til 3.5.7.2.1.2.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.1. Massi koltvísýringslosunar hreinna brunahreyfilsökutækja og tvinnrafökutækja sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.1.0. Lágmarks- og hámarkskoltvísýringsgildi innan brúnarhópsins

3.5.7.2.1.1. Hálosandi ökutæki: ..... g/km

3.5.7.2.1.1.0. Hálosandi ökutæki (nýja evrópska akstursloturan): ..... g/km

3.5.7.2.1.2. Láglosandi ökutæki (ef við á): ..... g/km

3.5.7.2.1.2.0. Láglosandi ökutæki (ef við á) (nýja evrópska akstursloturan): ..... g/km

3.5.7.2.1.3. Miðlosandi ökutæki (ef við á): ..... g/km

3.5.7.2.1.3.0. Miðlosandi ökutæki (ef við á) (nýja evrópska akstursloturan): ..... g/km“,

r) Í stað liða 3.5.7.2.2 til 3.5.7.2.2.3.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.2. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham frá tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.2.1. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham frá hálosandi ökutæki: g/km

3.5.7.2.2.1.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings frá hálosandi ökutæki (skilyrði B, nýja evrópska akstursslotan): g/km

3.5.7.2.2.2. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham frá láglosandi ökutæki (ef við á): g/km

3.5.7.2.2.2.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings frá (ef við á) hálosandi ökutæki (skilyrði B, nýja evrópska akstursslotan): g/km

3.5.7.2.2.3. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham frá miðlosandi ökutæki (ef við á): g/km

3.5.7.2.2.3.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings frá (ef við á) miðlosandi ökutæki (skilyrði B, nýja evrópska akstursslotan): g/km“,

s) Í stað liða 3.5.7.2.3. til 3.5.7.2.3.3.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.3. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham og vegin massalosun koltvísýrings frá tvinnrafökutækjum, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.3.1. Massalosun koltvísýrings frá hálosandi ökutæki í afhleðsluham: … g/km

3.5.7.2.3.1.0. Massalosun koltvísýrings frá hálosandi ökutæki í afhleðsluham (skilyrði A, nýja evrópska akstursslotan): … g/km

3.5.7.2.3.2. Massalosun koltvísýrings frá láglosandi ökutæki í afhleðsluham (ef við á): … g/km

3.5.7.2.3.2.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings frá (ef við á) hálosandi ökutæki í afhleðsluham (skilyrði A, nýja evrópska akstursslotan): … g/km

3.5.7.2.3.3. Massalosun koltvísýrings frá miðlosandi ökutæki (ef við á) í afhleðsluham: … g/km

3.5.7.2.3.3.0. Massalosun koltvísýrings frá (ef við á) miðlosandi ökutæki í afhleðsluham (skilyrði A, nýja evrópska akstursslotan): … g/km“,

t) Eftirfarandi liður 3.5.7.2.3.4 bætist við:

„3.5.7.2.3.4. Vegið lágmarks- og hámarkskoltvísýringsgildi innan brúnarhópsins fyrir ökutæki sem hægt er að hlaða utan ökutækis“,

u) Ákvæði liðar 3.5.7.4.3 falla brott,

v) Í stað liðar 3.5.8.3 kemur eftirfarandi:

„3.5.8.3. Losungargögn í tengslum við notkun vistvænnar nýsköpunar (gera skal sams konar töflu fyrir hvert viðmiðunareldsneyti sem er prófað) (w^1)

Ákvörðun um viðurkenningu á vistvænni nýsköpun (w^2)	Kóði fyrir vistvæna nýsköpun (w^3)	1. Koltvísýringslosun frá grunnviðmiðunarökutækinu (g/km)	2. Koltvísýringslosun frá ökutæki sem búið er vistvænni nýsköpun (g/km)	3. Losun koltvísýrings frá grunnviðmiðunarökutækinu í prófunarlotu prófunar 1 (w^4)	4. Losun koltvísýrings frá ökutæki sem búið er vistvænni nýsköpun í prófunarlotu 1	5. Notkunarstuðull (UF), þ.e. skipting í tímabil, sem tæknin er notuð við venjulegar notkunaraðstæður	Sparnaður í losun koltvísýrings ((1 – 2) – (3 – 4))*5
xxxx/201x							

Heildarsparnaður í losun koltvísýrings í nýju evrópsku akstursslotunni (g/km) (w^5)
Heildarsparnaður í losun koltvísýrings í WLTP-prófunaraðferðinni (g/km) (w^5)“,

w) eftirfarandi liður 3.8.5. bætist við:

„3.8.5. Forskrift smurefnis: …W…“,

x) Liðirnir 4.5.1.1, 4.5.1.2 and 4.5.1.3 falla brott,

y) Neðst í fyrsta dálki töflunnar í lið 4.6 fellur orðið „bakkgír“ brott,

z) Eftirfarandi færslur 4.6.1 til 4.6.1.7.1 bætast við:

„4.6.1. Gírskipting

4.6.1.1. Fyrsti gír undanskilinn: já/nei (1)

4.6.1.2. n_{95_high} fyrir hvern gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3. n_{min_drive}

4.6.1.3.1. Fyrsti gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.2. Fyrsti gír í annan gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.3. Annar gír í kyrrstöðu: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.4. Annar gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.5. Þriðji gír og ofar: … $mín^{-1}$

4.6.1.4. $n_{min\_drive\_set}$ í hröðunarfösum og fösum við stöðugan hraða ($n_{min\_drive\_up}$): … $mín^{-1}$

4.6.1.5. $n_{min\_drive\_set}$ í hraðaminnkunarfösum ($n_{min\_drive\_down}$):

4.6.1.6. upphaflegt tímabil

4.6.1.6.1. t_{start_phase}: … s

4.6.1.6.2. $n_{min\_drive\_start}$: … $mín^{-1}$

4.6.1.6.3. $n_{min\_drive\_up\_start}$: … $mín^{-1}$

4.6.1.7. notkun ASM: já/nei (1)

4.6.1.7.1. ASM-gildi: …“,

aa) eftirfarandi liður 4.12 bætist við:

„4.12. Smurolía fyrir gírkassa: …W…“,

ab) Liðir 9.10.3 og 9.10.3.1 falla brott,

ac) Eftirfarandi liðir 12.8 til 12.8.3.2 bætast við:

„12.8. Búnaður eða kerfi með valkvæðum notkunarhömum sem hafa áhrif á koltvísýringslosun og/eða markgildalosun og hafa ekki aðalham: já/nei (1)

12.8.1. Prófun í hleðsluham (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.1.1. Besti hamur: …

12.8.1.2. Versti hamur: …

12.8.2. Prófun í afhleðsluham (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.2.1. Besti hamur: …

12.8.2.2. Versti hamur: …

12.8.3. Prófun 1 (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.3.1. Besti hamur: …

12.8.3.2. Versti hamur: …“,

ad) Í 3. viðbæti fellur brott viðbætir við upplýsingaskjalið,

24) Ákvæðum 3. viðbætis a er breytt sem hér segir:

a) Í stað d-liðar komi eftirfarandi:

„d) ítarlegur, tæknilegur rökstuðningur fyrir hverja aukalosunaraðferð, þ.m.t. áhættumat til að meta áhættu með og án aukalosunaraðferðarinnar, ásamt upplýsingum um eftirfarandi:

i. hvers vegna undantekningarákvæði um bann við notkun temprunarbúnaðar í 2. mgr. 5. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007 eru í gildi,

ii. eftir atvikum, vélbúnaðareiningar sem verður að vernda með aukalosunaraðferðinni,

iii. eftir atvikum, sannanir um skyndilegar og óbætanlegar skemmdir á hreyfli sem ekki er unnt að koma í veg fyrir með reglulegu viðhaldi og myndu verða ef aukalosunaraðferðir væru ekki fyrir hendi,

iv. eftir atvikum, rökstudda skýringu á hvers vegna þörf er á að nota aukalosunaraðferð við ræsingu hreyfils,“,

b) Eftirfarandi 2. og 3. mgr. bætast við:

„Ítarlega upplýsingamappan skal takmörkuð við 100 blaðsíður og skal innihalda alla helstu þætti til að gera gerðarviðurkenningaryfirvaldinu kleift að meta aukalosunaraðferðina. Ef þörf krefur er heimilt að til viðbótar við möppuna séu viðaukar og önnur fylgiskjöl sem innihalda viðbótarþætti og þætti til fyllingar. Framleiðandinn skal senda nýja útgáfu af ítarlegu upplýsingamöppunni til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins í hvert sinn sem breytingar á aukalosunaraðferðinni eru innleiddar. Nýja útgáfan skal vera takmörkuð við breytingarnar og áhrif þeirra. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið skal leggja mat á og samþykkja nýja útgáfu aukalosunaraðferðinnar.

Ítarlega upplýsingamappan skal byggjast upp sem hér segir:

Ítarleg upplýsingamappa um beitingu aukalosunaraðferðar nr. YYY/OEM í samræmi við reglugerð (ESB) 2017/1151

Hlutar	Málsgrein	Liður	Skýring
Inngangsskjöl		Kynningarbréf til gerðarviðurkenningar-yfirvalds	Tilvísunarnúmer skjalsins með útgáfu, útgáfudag skjalsins, undirskrift viðeigandi aðila innan fyrirtækis framleiðandans
		Tafla yfir útgáfur	Umfang breytinga í hverri útgáfu og hvaða hlutum er breytt
		Lýsing á viðkomandi (losunar) tegundum	
		Tafla yfir fylgiskjöl	Listi yfir öll fylgiskjöl
		Millivísanir	Tenglar í a- til i-lið í 3. viðbæti a (staðsetning hverrar kröfu í reglugerðinni)
		Yfirlýsing um að temprunarbúnaður sé ekki til staðar	+ undirskrift
Kjarnaskjal	0	Upphafsstafaorð/skammstafanir	
	1	ALMENN LÝSING	
	1.1	Almenn framsetning hreyfils	Lýsing á helstu einkennum: slagrými, eftirmeðferð,...
	1.2	Almenn kerfishögun	Hagnýt skýringarmynd kerfis: listi yfir skynjara og gangsetningarbúnað, útskýring á almennum gangi hreyfils
	1.3	Aflestur á útgáfu hugbúnaðar og kvörðunar	T.d. útskýring á skönnunartæki

Hlutar	Málsgrein	Liður	Skýring
	2	Grunnlosunaraðferðir	
	2.x	Grunnlosunaraðferð x	Lýsing aðferðar x
	2.y	Grunnlosunaraðferð y	Lýsing aðferðar y
	3	Aukalosunaraðferðir	
	3.0	Framsetning aukalosunaraðferðar	Stigskipt fyrirkomulag milli mismunandi aukalosunaraðferða: lýsing og rökstuðningur (t.d. öryggi, áreiðanleiki, o.s.frv.)
	3.x	Aukalosunaraðferð x	3.x.1 Rökstuðningur á aukalosunaraðferð 3.x.2 Mældir og/eða líkansgerðir mæliþættir við lýsingu á eiginleikum aukalosunaraðferðar 3.x.3 Aðgerðahamur aukalosunaraðferðar - notaðir mæliþættir 3.x.4 Áhrif aukalosunaraðferðar á mengunarefni og koltvísýring
	3.y	Aukalosunaraðferð y	3.y.1 3.y.2 o.s.frv.
	100 blaðsíðna takmörkun endar hérna		
	Viðauki		Skrá yfir gerðir sem falla undir þessa grunnlosunar- og aukalosunaraðferð: þ.m.t. tilvísun í gerðarviðurkenningu, tilvísun í hugbúnað, kvörðunarnúmer, prófsummur á hverri útgáfu og á hverri stýrieiningu (hreyfill og/eða eftirmeðferðarkerfi, ef slíkt er til staðar)
Fylgiskjöl		Tæknileg athugasemd við rökstuðning fyrir aukalosunaraðferð n° xxx	Áhættumat eða rökstuðningur með prófun eða dæmi um skyndilegar skemmdir, ef einhver eru
		Tæknileg athugasemd með rökstuðningi fyrir aukalosunaraðferð n° yyy	
		Prófunarskýrsla fyrir mælingu á áhrifum tiltekinnar aukalosunaraðferðar	Prófunarskýrsla yfir allar sérstakar prófanir sem gerðar eru vegna rökstuðnings fyrir aukalosunaraðferð, upplýsingar um prófunarskilyrði, lýsing ökutækis og dagsetning á prófunum, áhrif losunar og koltvísýrings með og án aukalosunaraðferðar“,

25) Eftirfarandi 3. viðbætir b bætist við:

„3. viðbætir b

Aðferðafræði við mat á aukalosunaraðferð

Mat gerðarviðurkenningaryfirvaldsins á aukalosunaraðferðinni skal fela í sér a.m.k. eftirfarandi sannprófanir:

1) Halda skal aukningu losunar af völdum aukalosunaraðferðarinnar við lægsta mögulega stig:

   a) Halda skal aukningu á heildarlosun við notkun aukalosunaraðferðar við lægsta mögulega stig á öllum eðlilegum endingartíma ökutækisins og við venjulega notkun,

b) ef tækni eða hönnun sem myndi gera kleift að bæta stjórnun á losun er í boði á markaði þegar forkönnunin á aukalosunaraðferð á sér stað skal sú tækni eða hönnun notuð án órökstuddra breytinga.

2) Ef notkun aukalosunaraðferðar er rökstudd með hættunni á skyndilegum og óbætanlegum skemmdum á „orkubreyti fyrir knúningsorku og drifrás“, eins og skilgreint er í 2. sameiginlegri ályktun í samningum efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu frá 1958 og 1998 sem innihalda skilgreiningar á knúningskerfum ökutækja ([1]), skal sýna fram á þá hættu og skjalfesta hana með fullnægjandi hætti, þ.m.t. með eftirfarandi upplýsingum:

a) Framleiðandi skal leggja fram sönnun fyrir stórfelldum (þ.e. skyndilegum og óbætanlegum) skemmdum á hreyfli ásamt áhættumati sem inniheldur mat á hversu líkleg hættan er og á alvarleika mögulegra afleiðinga, þ.m.t. niðurstöður prófana sem framkvæmdar voru í þessu skyni,

b) ef tækni eða hönnun sem kemur í veg fyrir eða dregur úr þeirri hættu er í boði á markaði á meðan aukalosunaraðferðinni er beitt skal sú tækni eða hönnun notuð að svo miklu leyti sem er tæknilega mögulegt (þ.e. með engum órökstuddum breytingum),

c) ending og langtímavörn fyrir hreyfilinn eða íhluti mengunarvarnarkerfisins gagnvart sliti og bilunum telst ekki vera viðunandi ástæða til að veita undanþágu frá banninu við temprunarbúnaði.

3) Skjalfesta skal með fullnægjandi tæknilýsingu hvers vegna notkun aukalosunaraðferðar er nauðsynleg fyrir rekstraröryggi ökutækisins:

a) Framleiðandi ætti að leggja fram sönnun fyrir aukinni hættu gagnvart rekstraröryggi ökutækisins ásamt áhættumati sem inniheldur mat á hversu líkleg hættan er og á alvarleika mögulegra afleiðinga, þ.m.t. niðurstöður prófana sem framkvæmdar voru í þessu skyni,

b) ef önnur tækni eða hönnun sem gerir kleift að draga úr öryggisáhættu er í boði á markaði á meðan aukalosunaraðferðinni er beitt skal sú tækni eða hönnun notuð að svo miklu leyti sem er tæknilega mögulegt (þ.e. með engum órökstuddum breytingum).

4) Skjalfesta skal með fullnægjandi tæknilýsingu hvers vegna notkun aukalosunaraðferðar er nauðsynleg við ræsingu hreyfils:

a) framleiðandi skal leggja fram sönnun þess að þörf sé á notkun aukalosunaraðferðar við ræsingu hreyfils ásamt áhættumati sem inniheldur mat á hversu líkleg hættan er og á alvarleika mögulegra afleiðinga, þ.m.t. niðurstöður prófana sem framkvæmdar voru í þessu skyni,

b) ef önnur tækni eða hönnun sem gerir kleift að bæta mengunarvarnir við ræsingu hreyfils er í boði á markaði á meðan aukalosunaraðferðinni er beitt skal sú tækni eða hönnun notuð að svo miklu leyti sem er tæknilega mögulegt.“

26) Ákvæðum 4. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Eftirfarandi liður 0.4.2 bætist við í I. þætti í fyrirmyndinni að EB-gerðarviðurkenningarvottorði:

„0.4.2. Grunnökutæki ([5a]) ([1]): já/nei ([1])“,

b) Viðbótinni við EB-gerðarviðurkenningarvottorð er breytt sem hér segir:

i) í stað 0. liðar komi eftirfarandi:

„0. Auðkenni brúunarhóps eins og skilgreint er í lið 5.0 í XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151.

0.1. Auðkenni: …

0.2. Auðkenni grunnökutækis ([5a]) ([1]): …“,

ii) Í stað liða 1.1, 1.2 og 1.3 kemur eftirfarandi:

„1.1. Massi ökutækis tilbúins til aksturs:

Láglosandi ökutæki ([1]): …

Hálosandi ökutæki: …

1.2. Hámarksmassi:

Láglosandi ökutæki ([1]): …

Hálosandi ökutæki: …

([1]) Skjalið ECE/TRANS/WP.19/1121 er að finna á eftirfarandi vefsíðu: https://ec.europa.eu/docsroom/documents/31821

1.3. Viðmiðunarmassi:

Láglosandi ökutæki ([1]): …

Hálosandi ökutæki: …“,

iii) í stað liðar 2.1 komi eftirfarandi:

„2.1. Niðurstöður úr prófun á losun gegnum útblástursrör

Flokkun losunar: …

Niðurstöður úr prófun 1, ef við á

Gerðarviðurkenningarnúmer fyrir ökutæki önnur en stofnökutæki ([1]): …

Prófun 1

Niðurstöður úr prófun 1	Kolsýringur (mg/km)	THC (mg/km)	NMHC (mg/km)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x) (mg/km)	Heildarmagn vetniskolefna + NO_x (mg/km)	Agnamassi (mg/km)	Fjöldi agna (#.10^{11}/km)
Mælt gildi ([8]) ([9])							
Ki × ([8]) ([10])					([11])		
Ki + ([8]) ([10])					([11])		
Meðalgildi reiknað með Ki (M × Ki eða M + Ki) ([9])					([12])		
DF (+) ([8]) ([10])							
DF (×) ([8]) ([10])							
Lokameðalgildi reiknað með Ki og DF ([13])							
Viðmiðunarmörk							

Prófun 2 (ef við á)

Fyrir niðurstöður úr annarri prófun skal gera samskonar töflu og fyrir prófun 1.

Prófun 3 (ef við á)

Fyrir niðurstöður úr þriðju prófun skal gera samskonar töflu og fyrir prófun 1.

Fyrir láglosandi ökutæki (ef við á) og hálosandi ökutæki (ef við á) skal endurtaka prófun 1, prófun 2 (ef við á) og prófun 3 (ef við á)

Prófun með leiðréttingu á umhverfishita (ATCT-prófun)

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt
ATCT (14 °C) $M_{CO2,Treg}$	
Prófun 1 (23 °C) $M_{CO2,23°}$	
Leiðréttingarstuðull hóps (FCF)	

Niðurstaða ATCT-prófunar	Kolsýringur (mg/km)	THC (mg/km)	NMHC (mg/km)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x) (mg/km)	Heildarmagn vetniskolefna + NO_x (mg/km)	Agnamassi (mg/km)	Fjöldi agna (#.10^{11}/km)
Mæld (1) (2)							
Viðmiðunarmörk							

(1) Þar sem við á.
(2) Námundað að tveimur aukastöfum.

Mismunur á endanlegu hitastigi kælivökva hreyfils og meðalhita varmajafnvægissvæðis (e. *soak area*) síðustu 3 klukkustundir Δ_{T_ATCT} (°C) varðandi viðmiðunarökutækið: …

Lágmarksvarmajafnvægistími (e. *soaking time*) t_{soak}_ATCT (s): …

Staðsetning hitaskynjara: …

Auðkenni ATCT-hóps: …

Prófun 2: (þ.m.t. gögn sem krafist er vegna akstursháfniprófunar):

Prófun	CO-gildi (% miðað við rúmmál)	Lambda-gildi (1)	Snúningshraði hreyfils ($mín^{-1}$)	Hitastig á smurolíu (°C)
Prófun við hægan lausagang		Á ekki við		
Prófun við hraðan lausagang				

Prófun 3: …

Prófun 4: ... g/prófun,

Prófunaraðferð í samræmi við: 6. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 [nýja evrópska akturslotan í einn dag] / viðaukann við reglugerð (EB) 2017/1221 [nýja evrópska akturslotan í tvo daga] / VI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151[WLTP-prófunaraðferð í tvo daga] (1).

Prófun 5:

— Endingarprófun: prófun á öllu ökutækinu/öldrun í prófunarbekk/engin (1)

— Spillistuðull: reiknaður út/úthlutaður (1)

— Tilgreina skal gildin: …

— Viðeigandi prófunarlota 1 (4. undirviðauki við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 eða reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83) (14): …

Prófun 6	CO (g/km)	THC (g/km)
Mæligildi		
Viðmiðunarmörk“		

iv) Í stað liðar 2.5.1 kemur eftirfarandi:

„2.5.1. Hreint brunahreyfilsökutæki og tvinnrafökutæki sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu“,

v) Eftirfarandi liður 2.5.1.0 bætist við:

„2.5.1.0. Lágmarks- og hámarkskoltvísýringsgildi innan brúunarhópsins“,

vi) Í stað liða 2.5.1.1.3 og 2.5.1.1.4 kemur eftirfarandi:

„2.5.1.1.3. Massi koltvísýringslosunar (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi, fyrir samanlagða losun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151)

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}$ / $M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	í meðallagi					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,H}$ / $M_{CO2,c,H}$						

2.5.1.1.4. Eldsneytisnotkun (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi fyrir samanlagða notkun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka)

Eldsneytisnotkun (l/100 km) eða m^3/100 km eða kg/100 km (1)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{p,H}$ / $FC_{c,H}$“,					

vii) Í stað liða 2.5.1.2 til 2.5.1.3 kemur eftirfarandi:

„2.5.1.2. Láglosandi ökutæki (ef við á)

2.5.1.2.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.1.2.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.1.2.2.1. f_0, N: …

2.5.1.2.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.1.2.2.3. f_2, N/(km/klst.) (2): …

2.5.1.2.3. Massi koltvísýringslosunar (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi fyrir samanlagða losun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka)

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}$/$M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	í meðallagi					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,L}$ / $M_{CO2,c,L}$						

2.5.1.2.4. Eldsneytisnotkun (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi fyrir samanlagða notkun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka)

Eldsneytisnotkun (l/100 km) eða m^3/100 km eða kg/100 km (1)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{p,L}/FC_{c,L}$					

2.5.1.3. miðlosandi ökutæki í tengslum við tvinnrafökutæki, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu (ef við á)“,

viii) Eftirfarandi liðir 2.5.1.3.1 til 2.5.1.3.4 bætast við:

„2.5.1.3.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.1.3.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.1.3.2.1. $f_{0,}$ N: …

2.5.1.3.2.2. $f_{1,}$ N/(km/klst.): …

2.5.1.3.2.3. $f_{2,}$ N/(km/klst.) (2): …

2.5.1.3.3. Massi koltvísýringslosunar (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi fyrir samanlagða losun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka)

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}/M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	í meðallagi					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,L}$ / $M_{CO2,c,L}$						

2.5.1.3.4. Eldsneytisnotkun (tilgreina skal gildi fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er, fyrir fasana: mæligildi fyrir samanlagða notkun sjá liði 1.2.3.8 og 1.2.3.9 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka)

Eldsneytisnotkun (l/100 km) eða m^3/100 km eða kg/100 km (1)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{p,L}$ / $FC_{c,L}$“					

ix) Ákvæði liðar 2.5.1.3.1 falla brott,

x) Eftirfarandi liðir 2.5.1.4 og 2.5.1.4.1 bætast við:

„2.5.1.4. Fyrir ökutæki sem eru knúin með brunahreyfli og sem búin eru kerfum sem endurnýja sig reglubundið, eins og skilgreint er í 6. mgr. 2. gr. þessarar reglugerðar, skal leiðrétta niðurstöður úr prófunum með Ki-stuðlinum, eins og tilgreint er í 1. viðbæti við 6. undirviðauka við XXI. viðauka.

2.5.1.4.1. Upplýsingar um endurnýjunaraðferð með tilliti til losunar koltvísýrings og eldsneytisnotkunar

D — fjöldi prófunarlotna á milli tveggja lotna þar sem endurnýjunarstig á sér stað: …

d — fjöldi prófunarlotna sem þarf fyrir endurnýjun: …

Viðeigandi prófunarlota 1 (4. undirviðauki við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 eða reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83) ([14]): …

	Samanlagt
Ki (viðbætinn/margfaldandi) ([1]) Gildi fyrir koltvísýring og eldsneytisnotkun ([10])	

Endurtaka skal lið 2.5.1 ef um er að ræða grunnökutæki“.

xi) Í stað liða 2.5.2.1 til 2.5.2.1.2 kemur eftirfarandi:

„2.5.2.1. Raforkunotkun

2.5.2.1.1. Hálosandi ökutæki

2.5.2.1.1.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.2.1.1.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.2.1.1.2.1. f_0, N: …

2.5.2.1.1.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.2.1.1.2.3. f_2, N/(km/klst.) ([2]): …

Raforkunotkun (Wh/km)	Prófun	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknuð raforkunotkun	1		
	2		
	3		
	í meðallagi		
Tilgreint gildi		—	

2.5.2.1.1.3. Heildartími utan vikmarka við framkvæmd lotunnar: ... sek.

2.5.2.1.2. Láglosandi ökutæki (ef við á)

2.5.2.1.2.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.2.1.2.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.2.1.2.2.1. f_0, N: …

2.5.2.1.2.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.2.1.2.2.3. f_2, N/(km/klst.) ([2]): …

Raforkunotkun (Wh/km)	Prófun	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknuð raforkunotkun	1		
	2		
	3		
	í meðallagi		
Tilgreint gildi		—	

2.5.2.1.2.3. Heildartími utan vikmarka við framkvæmd lotunnar: … sek“,

xii) Í stað liðar 2.5.2.2 kemur eftirfarandi:

„2.5.2.2. Hrein rafdrægni

2.5.2.2.1. Hálosandi ökutæki

Hrein rafdrægni (PER) (km)	Prófun	Borgarakstur	Samanlagt
Mæld hrein rafdrægni	1		
	2		
	3		
	í meðallagi		
Tilgreint gildi		—	

2.5.2.2.2. Láglosandi ökutæki (ef við á)

Hrein rafdrægni (PER) (km)	Prófun	Borgarakstur	Samanlagt
Mæld hrein rafdrægni	1		
	2		
	3		
	í meðallagi		
Tilgreint gildi		—“	

xiii) Í stað liða 2.5.3.1 til 2.5.3.2 kemur eftirfarandi:

„2.5.3.1. Massi koltvísýringslosunar í hleðsluham (e. *charge sustaining*)

2.5.3.1.1. Hálosandi ökutæki

2.5.3.1.1.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.3.1.1.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.3.1.1.2.1. f_0, N: …

2.5.3.1.1.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.3.1.1.2.3. f_2, N/(km/klst.) (²): …

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}/M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	Meðaltal					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,H}$ / $M_{CO2,c,H}$						

2.5.3.1.2. Láglosandi ökutæki (ef við á)

2.5.3.1.2.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.3.1.2.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.3.1.2.2.1. f_0, N: …

2.5.3.1.2.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.3.1.2.2.3. f_2, N/(km/klst.) (2): …

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}/M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	Meðaltal					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,L}$ / $M_{CO2,c,L}$						

2.5.3.1.3. Miðlosandi ökutæki (ef við á)

2.5.3.1.3.1. Orkuþörf lotu: … J

2.5.3.1.3.2. Ökumótstöðustuðlar

2.5.3.1.3.2.1. f_0, N: …

2.5.3.1.3.2.2. f_1, N/(km/klst.): …

2.5.3.1.3.2.3. f_2, N/(km/klst.) (2): …

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
$M_{CO2,p,5}/M_{CO2,c,5}$	1					
	2					
	3					
	Meðaltal					
$M_{CO2,p,M}/M_{CO2,c,M}$						

2.5.3.2. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham (e. *charge depleting*)

Hálosandi ökutæki

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Samanlagt
$M_{CO2,CD}$	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanlegt gildi $M_{CO2,CD,H}$		

Láglosandi ökutæki (ef við á)

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Samanlagt
$M_{CO2,CD}$	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanlegt gildi $M_{CO2,CD,L}$		

Miðlosandi ökutæki (ef við á)

Koltvísýringslosun (g/km)	Prófun	Samanlagt
$M_{CO2,CD}$	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanlegt gildi $M_{CO2,CD,M}$“		

xiv) Eftirfarandi liður 2.5.3.3.1 bætist við í lið 2.5.3.3:

„2.5.3.3.1. Lágmarks- og hámarkskoltvísýringsgildi innan brúunarhópsins“,

xv) Í stað liðar 2.5.3.5 kemur eftirfarandi:

„2.5.3.5. Eldsneytisnotkun við afhleðslu

Hálosandi ökutæki

Eldsneytisnotkun (l/100km)	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{CD,H}$	

Láglosandi ökutæki (ef við á)

Eldsneytisnotkun (l/100km)	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{CD,L}$	

Miðlosandi ökutæki (ef við á)

Eldsneytisnotkun (l/100km)	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{CD,M}$“	

xvi) Í stað liðar 2.5.3.7.1 kemur eftirfarandi:

„2.5.3.7.1. Full rafdrægni (AER)

Full rafdrægni (km)	Prófun	Borgarakstur	Samanlagt
Gildi fyrir fulla rafdrægni	1		
	2		
	3		
	Meðaltal		
Endanleg gildi fyrir fulla rafdrægni“			

xvii) Í stað liðar 2.5.3.7.4 kemur eftirfarandi:

„2.5.3.7.4. Drægni í afhleðslulotu R_{CDC}

R_{CDC} (km)	Prófun	Samanlagt
R_{CDC}-gildi	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanleg R_{CDC}-gildi“		

xviii) Í stað liða 2.5.3.8.2 og 2.5.3.8.3 kemur eftirfarandi:

„2.5.3.8.2. Raforkunotkun, á grundvelli vegins notkunarstuðuls (e. *UF-weighted*), í afhleðsluham $EC_{AC,CD}$ (samanlögð)

$EC_{AC,CD}$ (Wh/km)	Prófun	Samanlagt
$EC_{AC,CD}$-gildi	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanleg $EC_{AC,CD}$-gildi		

2.5.3.8.3. Raforkunotkun $EC_{AC,\ weighted}$ (samanlögð) á grundvelli vegins notkunarstuðuls

$EC_{AC,weighted}$ (Wh/km)	Prófun	Samanlagt
$EC_{AC,weighted}$-gildi	1	
	2	
	3	
	Meðaltal	
Endanleg $EC_{AC,weighted}$-gildi		

Endurtaka skal lið 2.5.3 ef um er að ræða grunnökutæki“,

xix) eftirfarandi liður 2.5.4. bætist við:

„2.5.4. Ökutæki með efnarafala (FCV)

Eldsneytisnotkun (kg/100 km)	Samanlagt
Endanleg FC_c-gildi	

Endurtaka skal lið 2.5.4 ef um er að ræða grunnökutæki“,

xx) eftirfarandi liður 2.5.5. bætist við:

„2.5.5. Búnaður til að vakta eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun: já/á ekki við...“,

xxi) Eftirfarandi 5. nmgr. a bætist við í skýringunum:

„([5a]) eins og skilgreint er í 18. lið 3. gr. tilskipunar 2007/46/EBE“,

c) Viðbætinum við viðbótina við gerðarviðurkenningarvottorð er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrirsagnar 1. liðar kemur eftirfarandi:

„1. Koltvísýringslosun ákvörðuð í samræmi við lið 3.2 í I. viðauka við framkvæmdarreglugerðir (ESB) 2017/1152 og (ESB) 2017/1153“,

ii. Í stað liðar 2.1.1 kemur eftirfarandi:

„2.1.1. Massi koltvísýringslosunar (fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er) hreinna brunahreyfilsökutækja og tvinnrafökutækja, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Þéttbýli	Dreifbýli	Samanlagt
$M_{CO2,NEDC\_H,test}$“			

iii. Eftirfarandi liðir 2.1.2 og 2.1.2.1 bætast við:

„2.1.2. Niðurstaða OVC-prófunar

2.1.2.1. Massalosun koltvísýrings frá tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt
$M_{CO2,NEDC\_H,test,condition\ A}$	
$M_{CO2,NEDC\_H,test,condition\ B}$	
$M_{CO2,NEDC\_H,test,weighted}$“.	

iv. Í stað liðar 2.2.1 kemur eftirfarandi:

„2.2.1. Massi koltvísýringslosunar (fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er) hreinna brunahreyfilsökutækja og tvinnrafökutækja, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Þéttbýli	Dreifbýli	Samanlagt
$M_{CO2,NEDC\_L,test}$“.			

v. Eftirfarandi liðir 2.2.2 og 2.2.2.1 bætast við:

„2.2.2. Niðurstaða OVC-prófunar

2.2.2.1. Massalosun koltvísýrings frá tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt
$M_{CO2,NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$M_{CO2,NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$M_{CO2,NEDC\_L,test,weighted}$“.	

vi. Í stað 3. liðar kemur eftirfarandi:

„3. Fráviks- og sannprófunarstuðlar (ákvarðaðir í samræmi við lið 3.2.8 í framkvæmdarreglugerð (ESB) 2017/1152 og (ESB) 2017/1153).

Fráviksstuðull (ef við á)	
Sannprófunarstuðull (ef við á)	„1“ eða „0“
Tætiauðkenniskóði fullgerðu fylgniskrárinnar (liður 3.1.1.2 í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2017/1152 og (ESB) 2017/1153)“.	

vii. Eftirfarandi liðir 4. til 4.2.3 bætast við:

„4. Endanleg NEDC-gildi fyrir koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun

4.1. Endanleg NEDC-gildi (fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er) hreinna brunahreyfilsökutækja og tvinnrafökutækja, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu

		Þéttbýli	Dreifbýli	Samanlagt
Koltvísýringslosun (g/km)	$M_{CO2,NEDC\_L,\ final}$			
	$M_{CO2,NEDC\_H,\ final}$			
Eldsneytisnotkun (l/100km)	$FC_{NEDC\_L,\ final}$			
	$FC_{NEDC\_H,\ final}$			

4.2. Endanleg NEDC-gildi (fyrir hverja tegund viðmiðunareldsneytis sem prófuð er) tvinnrafökutækja, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu

4.2.1. Koltvísýringslosun (g/km): sjá liði 2.1.2.1 og 2.2.2.1.

4.2.2. Raforkunotkun (Wh/km): sjá liði 2.1.2.2 og 2.2.2.2.

4.2.3. Eldsneytisnotkun (l/100 km)

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Samanlagt
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$FC_{NEDC\_L,test,weighted}$“.	

27) Ákvæðum 6. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Töflu 1 er breytt sem hér segir:

i. Eftirfarandi kemur í stað línanna AG til AL:

„AG	Euro 6d-TEMP	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2017 (1)		31.8.2019
BG	Euro 6d-TEMP-EVAP	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2019
CG	Euro 6d-TEMP-ISC	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.1.2019		31.8.2019
DG	Euro 6d-TEMP-EVAP-ISC	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2019	1.9.2019	31.12.2020
AH	Euro 6d-TEMP	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2018 (1)		31.8.2019
BH	Euro 6d-TEMP-EVAP	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2020
CH	Euro 6d-TEMP-EVAP-ISC	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2019	1.9.2020	31.12.2021

AI	Euro 6d-TEMP	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2018 (1)		31.8.2019
BI	Euro 6d-TEMP-EVAP	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2020
CI	Euro 6d-TEMP-EVAP-ISC	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.9.2019	1.9.2020	31.12.2021
AJ	Euro 6d	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2019
AK	Euro 6d	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2020
AL	Euro 6d	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.8.2020
AM	Euro 6d-ISC	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.12.2020
AN	Euro 6d-ISC	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.12.2021
AO	Euro 6d-ISC	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)			31.12.2021
AP	Euro 6d-ISC-FCM	Euro 6-2	M, N1 I. flokkur	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.1.2020	1.1.2021	
AQ	Euro 6d-ISC-FCM	Euro 6-2	N1 undirflokkur II	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.1.2021	1.1.2022	
AR	Euro 6d-ISC-FCM	Euro 6-2	N1 undirflokkur III, N2	r.kv. (PI), þj.kv. (CI)	1.1.2021	1.1.2022“.	

b) Eftir töflu 1 bætist eftirfarandi texti við eftir skýringuna varðandi EURO 6d-TEMP:

„Euro 6c-TEMP-ISC losunarstaðall = prófun á losun í raunverulegum akstri miðað við tímabundna samræmisstuðla, allar kröfur um losun í gegnum útblástursrör samkvæmt Euro 6 (þ.m.t. fjöldi efnisagna, prófun á losun í raunverulegum akstri) og nýja aðferð varðandi samræmi ökutækja í notkun,

Euro 6c-TEMP-EVAP-ISC losunarstaðall = prófun á losun köfnunarefnisoxíða í raunverulegum akstri miðað við tímabundna samræmisstuðla, allar kröfur um losun í gegnum útblástursrör samkvæmt Euro 6 (þ.m.t. fjöldi efnisagna, prófun á losun í raunverulegum akstri), prófunaraðferð fyrir losun við uppgufun 48H og nýja aðferð varðandi samræmi ökutækja í notkun,",

c) Eftir töflu 1 bætist eftirfarandi texti við eftir skýringuna varðandi EURO 6d:

„Euro 6d-ISC = prófun á losun í raunverulegum akstri miðað við endanlega samræmisstuðla, allar kröfur um losun í gegnum útblástursrör samkvæmt Euro 6, prófunaraðferð fyrir losun við uppgufun í 48 klukkustundir og nýja aðferð varðandi samræmi ökutækja í notkun.

„Euro 6d-ISC-FCM = prófun á losun í raunverulegum akstri miðað við endanlega samræmisstuðla, allar kröfur um losun í gegnum útblástursrör samkvæmt Euro 6, prófunaraðferð fyrir losun við uppgufun í 48 klukkustundir, búnað til að vakta eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun og nýja aðferð varðandi samræmi ökutækja í notkun.“

28) Í stað 8. viðbætis a til 8. viðbætis c kemur eftirfarandi:

„8. viðbætir a

Prófunarskýrslur

Prófunarskýrsla er skýrsla gefin út af tækniþjónustunni sem annast prófanir samkvæmt þessari reglugerð.

I. HLUTI

Eftirfarandi upplýsingar, ef við á, eru lágmarksgögn sem krafist er við prófun 1.

Númer SKÝRSLU

UMSÆKJANDI			
Framleiðandi			
VIÐFANGSEFNI	…		
Auðkenni ökumótstöðuhóps eða ökumótstöðuhópa		:	
Auðkenni brúunarhóps eða brúunarhópa		:	
Prófaður hlutur			
	Tegund	:	
	Auðkenni brúunarhóps	:	
NIÐURSTAÐA	Hlutur sem var lagður fram til prófunar uppfyllir kröfurnar sem um getur í liðnum „Viðfangsefni.“		

STAÐUR,	dd/mm/áááá

Almennar athugasemdir:

Ef nokkrir valkostir (tilvísanir) eru fyrir hendi, ætti að lýsa þeim sem prófaður er í prófunarskýrslunni.

Ef slíkt er ekki fyrir hendi getur ein tilvísun í upplýsingaskjalið í upphafi prófunarskýrslunnar verið fullnægjandi.

Sérhverri tækniþjónustu er frjálst að leggja fram viðbótarupplýsingar.

a) Sérstakar upplýsingar varðandi hreyfla með rafkveikju

b) Sérstakar upplýsingar varðandi þjöppukveikjuhreyfla

1. LÝSING Á PRÓFUNARÖKUTÆKI EÐA -ÖKUTÆKJUM: HÁLOSANDI, LÁGLOSANDI OG MIÐLOSANDI (EF VIÐ Á)

1.1. **Almenn atriði**

Númer ökutækis	:	Númer frumgerðar og verksmiðjunúmer ökutækis
Flokkur	:	
Yfirbygging	:	
Knúin hjól	:	

1.1.1. *Uppbygging aflrásar*

Uppbygging aflrásar	:	hreinn brunahreyfill, tvinn-, rafmagns- eða efnarafali

1.1.2. *BRUNAHREYFILL (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvern brunahreyfil umfram einn

Tegund	:					
Tegund	:					
Vinnsluháttur	:	tvígengis-/fjórgengishreyfill				
Fjöldi og fyrirkomulag strokka	:					
Slagrými hreyfils (cm^3)	:					
Snúningshraði hreyfils í lausagangi ($mín^{-1}$)	:		+			
Mikill snúningshraði hreyfils í lausagangi ($mín^{-1}$) (a)	:		+			
Málafl hreyfils	:		kW	við		snún./mín.
Hámarkssnúningsvægi (nettó)	:		Nm	við		snún./mín.
Smurolía fyrir hreyfla	:	tegund og gerð:				
Kælikerfi	:	Gerð: loft/vatn/olía				
Einangrun	:	efni, magn, staðsetning, rúmmál og þyngd				

1.1.3. *PRÓFUNARELDSNEYTI fyrir prófun 1 (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvert prófunareldsneyti umfram eitt

Tegund	:	
Tegund	:	E10 bensín – B7 dísilolía – fljótandi jarðolíugas – jarðgas – …
Eðlismassi við 15 °C	:	
Brennisteinsinnihald	:	Eingöngu fyrir B7 dísilolíu og E10 bensín
	:	
Númer framleiðslulotu	:	
Willans-stuðlar (fyrir brunahreyfil) fyrir koltvísýringslosun (gCO_2/MJ)	:	

1.1.4. *ELDSNEYTISGJAFARKERFI (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvert eldsneytisgjafarkerfi umfram eitt

Bein innsprautun	:	já/nei eða lýsing
Ökutæki eftir tegund eldsneytis	:	Einseldsneytisökutæki, tvíeldsneytisökutæki, ökutæki knúið fjölblöndueldsneyti
Stýrieining		
Hlutatilvísun	:	sama og í upplýsingaskjali
Hugbúnaðarprófun	:	lesið með skönnunartæki, til dæmis
Loftstreymismælir	:	
Spjaldhús	:	
Þrýstiskynjari	:	
Innsprautunardæla	:	
Innsprautunarloki(-lokar) með dælu	:	

1.1.5. *INNTAKSKERFI (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvert inntakskerfi umfram eitt

Forþjappa	:	Já/nei tegund & gerð (1)
Millikælir	:	já/nei gerð (loft/loft-loft/vatn) (1)
Loftsía (hlutur) (1)	:	tegund & gerð
Inntakshljóðdeyfir (1)	:	tegund & gerð

1.1.6. *ÚTBLÁSTURSKERFI OG KERFI TIL VARNAR UPPGUFUN (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvert kerfi umfram eitt

Fyrri hvarfakútur	:	tegund & tilvísun (1) vinnsluháttur: þrívirkur/oxandi/NO_x-gildra/NO_x-geymslukerfi/valvís, hvötuð afoxun…
Seinni hvarfakútur	:	tegund & tilvísun (1) vinnsluháttur: þrívirkur/oxandi/NO_x-gildra/NO_x-geymslukerfi/valvís, hvötuð afoxun…
Agnasía	:	með/án/á ekki við hvötuð: já/nei tegund & tilvísun (1)
Tilvísun og staðsetning súrefnisskynjara	:	framan við hvata/aftan við hvata
Loftinndæling	:	með/án/á ekki við
Vatnsinnsprautun	:	með/án/á ekki við
Útblásturshringrás	:	með/án/á ekki við kæld/ókæld Háþrýstingur/lágþrýstingur
Mengunarvarnarkerfi fyrir losun við uppgufun	:	með/án/á ekki við
Tilvísun og staðsetning NO_x-skynjara	:	framan við/aftan við
Almenn lýsing (1)	:	

1.1.7. *VARMAGEYMSLUBÚNAÐUR (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvern varmageymslubúnað umfram einn

Varmageymslubúnaður	:	já/nei
Varmarýmd (geymt vermi J)	:	
Tími hitalosunar (s)	:	

1.1.8. *GÍRSKIPTING (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hverja gírskiptingu umfram eina

Gírkassi	:	beinskiptur/sjálfskiptur/stiglaus breyting
Aðferð við gírskiptingu		
Aðalhamur (*)	:	já/nei venjulegur/akstur/vistvænn/…
Besti hamur að því er varðar koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun (ef við á)	:	
Versti hamur að því er varðar koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun (ef við á)	:	
Hamur með mestu raforkunotkun (ef við á)	:	
Stýrieining	:	
Smurolía fyrir gírkassa	:	tegund og gerð:
Hjólbarðar		
Tegund	:	
Tegund	:	
Stærð að framan/aftan	:	
Virkt veltiummál í akstri (m)	:	
Loftþrýstingur í hjólbörðum (kPa)	:	

(*) í tengslum við tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal tilgreina hann fyrir rekstrarskilyrði í hleðsluham og afhleðsluham.

Yfirfærsluhlutfall, fyrsta hlutfall og (hraði ökutækis (km/klst.)/(snúningshraði hreyfils (1000 (mín $^{-1}$)) (V_{1000}) fyrir hvert gírhlutfall.

Gírhlutfall	Fyrsta hlutfall	Yfirfærsluhlutfall	V_{1000}
Fyrsta	1/1		
Annað	1/1		
Þriðja	1/1		
Fjórða	1/1		
Fimmta	1/1		
…			

1.1.9. *RAFVÉL (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hverja rafvél umfram eina

Tegund	:	
Tegund	:	
Toppgildi afls (kW)	:	

1.1.10. *ENDURHLAÐANLEG RAFORKUGEYMSLUKERFI MEÐ DRIFRAFGEYMI (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvert endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi með drifrafgeymi umfram eitt

Tegund	:	
Tegund	:	
Rúmtak (Ah)	:	
Málspenna (V)	:	

1.1.2011. *EFNARAFALI (ef við á)*

Endurtakið liðinn fyrir hvern efnarafala umfram einn

Tegund	:	
Tegund	:	
Hámarksafl (kW)	:	
Málspenna (V)	:	

1.1.2012. *AFLRAFEINDATÆKNI (ef við á)*

Getur verið fleiri en ein mismunandi aflrafeindatækni (knúningsorkubreytir, lágspennukerfi eða hleðslutæki)

Tegund	:	
Gerð	:	
Afl (kW)	:	

1.2. **Lýsing á hálosandi ökutæki**

1.2.1. *MASSI*

Prófunarmassi hálosandi ökutækis (kg)	:	

1.2.2. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR ÖKUMÓTSTÖÐU*

f_0 (N)	:	
f_1 (N/(km/klst.))	:	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	:	
Orkuþörf í lotu (J)	:	
Tilvísun í prófunarskýrslu fyrir ökumótstöðu	:	
Auðkenni ökumótstöðuhóps	:	

1.2.3. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR VAL Á LOTU*

Lota (án niðurskölunar)	:	Flokkur 1/2/3a/3b
Hlutfall nafnafls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs (PMR)(W/kg)	:	(ef við á)
Ferli sem hefur efri hraðamörk meðan á mælingum stendur	:	já/nei
Hámarkshraði ökutækisins (km/klst.)	:	

Niðurskölun (ef við á)	:	já/nei
Niðurskölunarstuðull fdsc	:	
Vegalengd lotu (m)	:	
Jafnhraði (ef um er að ræða stytt prófunarferli)	:	ef við á

1.2.4. *GÍRSKIPTIPUNKTUR (EF VIÐ Á)*

Útgáfa útreiknings á gírskiptingu		(tilgreina skal viðeigandi breytingu á reglugerð (ESB) 2017/1151)
Gírskipting	:	Meðalgír fyrir $v \geq 1$ km/klst., námundað að fjórum aukastöfum
nmin drive		
Fyrsti gír:	:	…mín^{-1}
Fyrsti gír í annan gír	:	…mín^{-1}
Annar gír í kyrrstöðu	:	…mín^{-1}
Annar gír	:	…mín^{-1}
Þriðji gír og ofar	:	…mín^{-1}
Fyrsta gír sleppt	:	já/nei
n_95_high fyrir hvern gír	:	…mín^{-1}
n_min_drive_set í hröðunarfösum og fösum við stöðugan hraða (n_min_drive_up)	:	…mín^{-1}
n_min_drive_set í hraðaminnkunarfösum (nmin_ drive_down)	:	…mín^{-1}
t_start_phase	:	...s
n_min_drive_start	:	…mín^{-1}
N_min_drive_up_start	:	…mín^{-1}
notkun ASM	:	já/nei
ASM-gildi:	:	

1.3. **Lýsing á láglosandi ökutæki (ef við á)**

1.3.1. *MASSI*

Prófunarmassi láglosandi ökutækis (kg)	:	

1.3.2. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR ÖKUMÓTSTÖÐU*

f_0 (N)	:	
f_1 (N/(km/klst.))	:	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	:	
Orkuþörf í lotu (J)	:	
$\Delta(C_D \times A_f)_{LH}$ (m^2)	:	

Tilvísun í prófunarskýrslu fyrir ökumótstöðu	:	
Auðkenni ökumótstöðuhóps	:	

1.3.3. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR VAL Á LOTU*

Lota (án niðurskölunar)	:	Flokkur 1/2/3a/3b
Hlutfall nafnafls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs (PMR)(W/kg)	:	(ef við á)
Ferli sem hefur efri hraðamörk meðan á mælingum stendur	:	já/nei
Hámarkshraði ökutækisins	:	
Niðurskölun (ef við á)	:	já/nei
Niðurskölunarstuðull fdsc	:	
Vegalengd lotu (m)	:	
Jafnhraði (ef um er að ræða stytt prófunarferli)	:	ef við á

1.3.4. *GÍRSKIPTIPUNKTUR (EF VIÐ Á)*

Gírskipting	:	Meðalgír fyrir $v \geq 1$ km/klst., námundað að fjórum aukastöfum

1.4. **Lýsing á miðlosandi ökutæki (ef við á)**

1.4.1. *MASSI*

Prófunarmassi láglosandi ökutækis (kg)	:	

1.4.2. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR ÖKUMÓTSTÖÐU*

f_0 (N)	:	
f_1 (N/(km/klst.))	:	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	:	
Orkuþörf í lotu (J)	:	
$\Delta(C_D \times A_f)_{LH}$ (m^2)	:	
Tilvísun í prófunarskýrslu fyrir ökumótstöðu	:	
Auðkenni ökumótstöðuhóps	:	

1.4.3. *MÆLIÞÆTTIR FYRIR VAL Á LOTU*

Lota (án niðurskölunar)	:	Flokkur 1/2/3a/3b
Hlutfall nafnafls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs (PMR)(W/kg)	:	(ef við á)
Ferli sem hefur efri hraðamörk meðan á mælingum stendur	:	já/nei
Hámarkshraði ökutækisins	:	

Niðurskölun (ef við á)	:	já/nei
Niðurskölunarstuðull fdsc	:	
Vegalengd lotu (m)	:	
Jafnhraði (ef um er að ræða stytt prófunarferli)	:	ef við á

1.4.4. *GÍRSKIPTIPUNKTUR (EF VIÐ Á)*

Gírskipting	:	Meðalgír fyrir $v \geq 1$ km/klst., námundað að fjórum aukastöfum

2. NIÐURSTÖÐUR PRÓFANA

2.1. **Prófun 1**

Aðferð við stillingu vegkeflis	:	ekið með fastri stillingu/ítrunaraðferð/annars konar aðferð með eigin upphitunarlotu
Aflmælir í notkun með tvíhjóladrifi/fjórhjóladrifi	:	Tvíhjóladrif/fjórhjóladrif
Snerist ásinn sem er ekki með afl við notkun með tvíhjóladrifi	:	Já/nei/á ekki við
Notkunarhamur aflmælis		já/nei
Fríhjólunarhamur	:	já/nei
Viðbótarformeðhöndlun	:	já/nei lýsing
Spillistuðlar	:	úthlutaðir/prófaðir

2.1.1. *Hálosandi ökutæki*

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staðsetning prófunar	:	vegkefli, staðsetning, land
Hæð neðri brúnar kæliviftu frá jörðu (cm)	:	
Hliðarstaða miðju viftunnar (ef breytt að ósk framleiðanda)	:	á miðlínu ökutækis/...
Fjarlægð frá framenda ökutækisins (cm)	:	
IWR: Mat á tregðuvinnu (e. *Inertial Work Rating*) (í %)	:	x,x
RMSSE: Kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika (e. *Root Mean Squared Speed Error*) (í km/klst.)	:	x,xx
Lýsing á samþykktu fráviki frá akursturslotu	:	Hreint rafökutæki á undan rofviðmiðunum eða Eldsneytisfetill stiginn í botn

2.1.1.1. Losun mengandi efna (ef við á)

2.1.1.1.1. Losun mengandi efna frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar 1

Neðangreindir liðir skulu endurteknir fyrir hvern prófaðan valkvæðan notkunarham (aðalham eða besta og versta hugsanlega ham, ef við á)

Prófun 1

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Mæligildi							
Endurnýjunarstuðlar (Ki)(2) Viðbætnir							
Endurnýjunarstuðlar (Ki)(2) Margfaldandi							
Viðbætnir spillistuðlar							
Margfaldandi spillistuðlar							
Lokagildi							
Viðmiðunarmörk							

2) Sjá skýrslu eða skýrslur fyrir Ki-hóp	:	
Prófun 1/I framkvæmd til að ákvarða Ki	:	Ákvæði 4. undirviðauka við XXI. viðauka eða reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 (2)
Auðkenni endurnýjunarhóps	:	

(2) Tilgreinið eftir því sem við á

Prófun 2 (ef við á): vegna koltvísýrings (d_{CO2}[1])/vegna mengunarefna (90% af losunarmörkunum)/vegna beggja

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 ef við á: vegna koltvísýrings (d_{CO2}[2])

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

2.1.1.1.2. Losun mengandi efna frá tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til afhleðsluprófunar 1

Prófun 1

Losunarmörk mengandi efna skulu uppfyllt og eftirfarandi liður skal endurtekin fyrir hverja ekna prófunarlotu.

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Mæld gildi einnar lotu							
Viðmiðunarmörk einnar lotu							

Prófun 2 (ef við á): vegna koltvísýrings (d_{CO2}[1])/vegna mengunarefna (90% af losunarmörkunum)/vegna beggja

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á): vegna koltvísýrings (d_{CO2}^2)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

2.1.1.1.3. LOSUN MENGANDI EFNA FRÁ TVINNRAFÖKUTÆKJUM SEM ERU ÆTLUÐ FYRIR YTRI HLEÐSLU, Á GRUNDVELLI VEGINS NOTKUNARSTUÐULS

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Reiknuð gildi							

2.1.1.2. Koltvísýringslosun (ef við á)

2.1.1.2.1. Koltvísýringslosun frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar 1

Neðangreindir liðir skulu endurteknir fyrir hvern prófaðan valkvæðan notkunarham (aðalham eða besta og versta hugsanlega ham, ef við á)

Prófun 1

Koltvísýringslosun	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Mæligildi $M_{CO2,p,1}$					—
Gildi $M_{CO2,p,1b}$ / $M_{CO2,c,2}$ leiðrétt út frá hraða og vegalengd					
Leiðréttingarstuðull fyrir hleðslujafn-vægi endurhlaðanlegs raforkugeymslu-kerfis: (5)					
$M_{CO2,p,3}$ / $M_{CO2,c,3}$					
Endurnýjunarstuðlar (Ki) Viðbætnir					
Endurnýjunarstuðlar (Ki) Margfaldandi					
$M_{CO2,c,4}$	—				
$AF_{Ki} = M_{CO2,c,3} / M_{CO2,c,4}$	—				
$M_{CO2,p,4}$ / $M_{CO2,c,4}$					—
ATCT-leiðrétting (FCF) (4)					
Tímabundin gildi $M_{CO2,p,5}$ / $M_{CO2,c,5}$					
Tilgreint gildi	—	—	—	—	
d_{CO2}^1 * yfirlýst gildi	—	—	—	—	

4) FCF: Leiðréttingarstuðull hóps (e. *family correction factor*) til að leiðrétta hitaskilyrði sem eru dæmigerð fyrir svæðið (ATCT)

Sjá skýrslu eða skýrslur fyrir leiðréttingarstuðul hóps	:	
Auðkenni ATCT-hóps	:	

5) leiðrétting eins og um getur í 2. viðbæti við 6. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 varðandi hrein brunahreyfilsökutæki og 2. viðbæti við 8. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 varðandi tvinnrafökutæki (K_{CO2})

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða

Koltvísýringslosun (g/km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Reiknað meðaltal $M_{CO2,p,6}$ / $M_{CO2,c,6}$					
Samræming $M_{CO2,p,7}$ / $M_{CO2,c,7}$					
Endanleg gildi $M_{CO2,p,H}$ / $M_{CO2,c,H}$					

Upplýsingar varðandi samræmi framleiðslu í tengslum við tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu

	Samanlagt
Koltvísýringslosun (g/km) $M_{CO2,CS,COP}$	
$AF_{CO2,CS}$	

2.1.1.2.2. Massi koltvísýringslosunar frá tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til afhleðsluprófunar 1

Prófun 1

Massi koltvísýringslosunar (g/km)	Samanlagt
Reiknað gildi $M_{OC2,CD}$	
Tilgreint gildi	
d_{CO2}[1]	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða

Massi koltvísýringslosunar (g/km)	Samanlagt
Reiknað meðaltal $M_{CO2,CD}$	
Endanlegt gildi $M_{OC2,CD}$	

2.1.1.2.4. MASSI KOLTVÍSÝRINGSLOSUNAR FRÁ TVINNRAFÖKUTÆKJUM SEM ERU ÆTLUÐ FYRIR HLEÐSLU UTAN ÖKUTÆKIS Á GRUNDVELLI VEGINS NOTKUNARSTUÐULS

Massi koltvísýringslosunar (g/km)	Samanlagt
Reiknað gildi $M_{OC2,weighted}$	

2.1.1.3 ELDSNEYTISNOTKUN (EF VIÐ Á)

2.1.1.3.1. Eldsneytisnotkun ökutækja sem eru aðeins með brunahreyfil, tvinnrafökutækja sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækja sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar 1

Neðangreindir liðir skulu endurteknir fyrir hvern prófaðan valkvæðan notkunarham (aðalham eða besta og versta hugsanlega ham, ef við á)

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Endanleg gildi $FC_{p,H}$ / $FC_{c,H}$ (6)					

(6) Reiknað út frá samræmdum koltvísýringsgildum

A- eldsneyti um borð og/eða vöktun orkunotkunar fyrir ökutæki sem um getur í 4. gr. a

a. Aðgengi að gögnum

Mæliþættirnir sem eru tilgreindir í 3. lið í XXII. viðauka eru aðgengilegir: já/á ekki við

b. Nákvæmni (ef við á)

$Fuel\_Consumed_{WLTP}$ (í lítrum) (1)	Hálosandi ökutæki - prófun 1	x,xxx
	Hálosandi ökutæki - prófun 2 (ef við á)	x,xxx
	Hálosandi ökutæki - prófun 3 (ef við á)	x,xxx
	Láglosandi ökutæki - prófun 1 (ef við á)	x,xxx
	Láglosandi ökutæki - prófun 2 (ef við á)	x,xxx
	Láglosandi ökutæki - prófun 3 (ef við á)	x,xxx
	Samtals	x,xxx
$Fuel\_Consumed_{OBFCM}$ (í lítrum) (1)	Hálosandi ökutæki - prófun 1	x,xx
	Hálosandi ökutæki - prófun 2 (ef við á)	x,xx
	Hálosandi ökutæki - prófun 3 (ef við á)	x,xx
	Láglosandi ökutæki - prófun 1 (ef við á)	x,xx
	Láglosandi ökutæki - prófun 2 (ef við á)	x,xx
	Láglosandi ökutæki - prófun 3 (ef við á)	x,xx
	Samtals	x,xx
Nákvæmni (1)		x,xxx

(8) í samræmi við XXII. viðauka

2.1.1.3.2. Eldsneytisnotkun tvinnrafökutækja sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til afhleðsluprófunar 1

Prófun 1:

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Samanlagt
Reiknað gildi FC_{CD}	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða

Eldsneytisnotkun (l/100km)	Samanlagt
Reiknað meðaltal FC_{CD}	
Endanlegt gildi FC_{CD}	

2.1.1.3.3. Eldsneytisnotkun tvinnrafökutækja sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu á grundvelli vegins notkunarstuðuls

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Samanlagt
Reiknað gildi $FC_{weighted}$	

2.1.1.3.4. Eldsneytisnotkun tvinnrafökutækja með efnarafala sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar 1

Neðangreindir liðir skulu endurteknir fyrir hvern prófaðan valkvæðan notkunarham (aðalham eða besta og versta hugsanlega ham, ef við á)

Eldsneytisnotkun (kg/100 km)	Samanlagt
Mæligildi	
Leiðréttingarstuðull fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis	
Endanleg FC_c-gildi	

2.1.1.4. DRÆGNI (EF VIÐ Á)

2.1.1.4.1. Drægni tvinnrafökutækja sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu (ef við á)

2.1.1.4.1.1. Full rafdrægni

Prófun 1

Full rafdrægni (km)	Borgarakstur	Samanlagt
Mæld/reiknuð gildi fyrir fulla rafdrægni		
Tilgreint gildi	—	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða

Full rafdrægni (km)	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknað meðaltal fyrir fulla rafdrægni (ef við á)		
Endanleg gildi fyrir fulla rafdrægni		

2.1.1.4.1.2. Jafngild, full rafdrægni (EAER)

EAER (km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Borgarakstur	Samanlagt
Endanleg EAER-gildi						

2.1.1.4.1.3. Raundrægni í afhleðsluham

R_{CDA} (km)	Samanlagt
Endanleg R_{CDA}-gildi	

2.1.1.4.1.4. Drægni í afhleðslulotu

Prófun 1

R_{CDC} (km)	Samanlagt
Endanleg R_{CDC}-gildi	
Skrárnúmer umbreytingarlotunnar	
Hlutfallsleg raforkubreyting (REEC) í staðfestingarlotu (%)	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

2.1.1.4.2. Drægni hreinna rafökutækja - hrein rafdrægni (ef við á)

Prófun 1

Hrein rafdrægni (PER) (km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknuð gildi fyrir hreina rafdrægni						
Tilgreint gildi	—	—	—	—	—	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða

Hrein rafdrægni (PER) (km)	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknað meðaltal fyrir hreina rafdrægni		
Endanleg gildi fyrir hreina rafdrægni		

2.1.1.5. RAFORKUNOTKUN (EF VIÐ Á)

2.1.1.5.1. Raforkunotkun tvinnrafökutækja sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu (ef við á)

2.1.1.5.1.1. Raforkunotkun

Raforkunotkun (Wh/km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Borgarakstur	Samanlagt
Endanleg gildi raforkunotkunar						

2.1.1.5.1.2. Raforkunotkun í afhleðsluham á grundvelli vegins notkunarstuðuls

Prófun 1

$EC_{AC,CD}$ (Wh/km)	Samanlagt
Reiknað gildi $EC_{AC,CD}$	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða (ef við á)

$EC_{AC,CD}$ (Wh/km)	Samanlagt
Reiknað meðaltal $EC_{AC,CD}$	
Endanlegt gildi	

2.1.1.5.1.3. Raforkunotkun á grundvelli vegins notkunarstuðuls

Prófun 1

$EC_{AC,weighted}$ (Wh)	Samanlagt
Reiknað gildi $EC_{AC,weighted}$	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Niðurstaða (ef við á)

$EC_{AC,weighted}$ (Wh/km)	Samanlagt
Reiknað meðaltal $EC_{AC,weighted}$	
Endanlegt gildi	

2.1.1.5.1.4. Upplýsingar fyrir samræmi framleiðslu

	Samanlagt
Raforkunotkun (Wh/km) $EC_{DC,CD,COP}$	
$AF_{EC,AC,CD}$	

2.1.1.5.2. Raforkunotkun hreinna rafökutækja (ef við á)

Prófun 1

Raforkunotkun (Wh/km)	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknuð gildi raforkunotkunar		
Tilgreint gildi	—	

Prófun 2 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Prófun 3 (ef við á)

Skrá skal niðurstöður úr prófun í samræmi við töfluna fyrir prófun 1

Raforkunotkun (Wh/km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Borgarakstur	Samanlagt
Reiknað meðaltal raforkunotkunar						
Endanleg gildi raforkunotkunar						

Upplýsingar fyrir samræmi framleiðslu

	Samanlagt
Raforkunotkun (Wh/km) $EC_{DC,COP}$	
AF_{EC}	

2.1.2. *LÁGLOSANDI ÖKUTÆKI (EF VIÐ Á)*

Endurtakið lið 2.1.1.

2.1.3. *MIÐLOSANDI ÖKUTÆKI (EF VIÐ Á)*

Endurtakið lið 2.1.1.

2.1.4. *LOKAGILDI FYRIR MARKGILDALOSUN (EF VIÐ Á)*

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunarefnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Hæstu gildi ([3])							

([3]) fyrir hvert mengunarefni í öllum prófunarniðurstöðum fyrir hálosandi, láglosandi (ef við á) og miðlosandi (ef við á) ökutæki

2.2. **Prófun 2 (a)**

Þ.m.t. upplýsingar um losun sem krafist er vegna akstursháfniprófunar

Prófun	Kolsýringur (% miðað við rúmmál)	Lambda-gildi ([x])	Snúningshraði hreyfils ($mín^{-1}$)	Hitastig olíu (°C)
Lausagangur		—		
Hraður lausagangur				

([x]) Strikið yfir það sem á ekki við (í sumum tilvikum þarf ekki að strika yfir neitt þegar fleiri en ein færsla á við)

2.3. **Prófun 3 (a)**

Losun lofttegunda úr sveifarhúsi út í andrúmsloftið: engin

2.4. **Prófun 4 (a)**

Auðkenni hóps	:	
Sjá skýrslu eða skýrslur	:	

2.5. **Prófun 5**

Auðkenni hóps	:	
Sjá skýrslu eða skýrslur hóps um endingu	:	
Prófunarlota 1/I til að prófa fyrir markgildalosun	:	Ákvæði 4. undirviðauka við XXI. viðauka eða reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 ([3])

([3]) Tilgreinið eftir því sem við á

2.6. **Prófun á losun í raunverulegum akstri (RDE-prófun)**

Hópnúmer losunar í raunverulegum akstri	:	MSxxxx
Sjá skýrslu eða skýrslur hóps	:	

2.7. **Prófun 6 (a)**

Auðkenni hóps		
Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staður prófunar	:	
Aðferð við stillingu vegkeflis	:	fríhjólun (viðmiðunarökumótstaða)
Tregðumassi (kg)	:	
Ef frávik frá prófun 1	:	
Hjólbarðar	:	
Tegund	:	
Gerð	:	
Stærð að framan/aftan	:	
Virkt veltiummál í akstri (m)	:	
Loftþrýstingur í hjólbörðum (kPa)	:	

Mengunarefni		Kolsýringur (g/km)	HC (g/km)
Prófun	1		
	2		
	3		
Meðaltal			
Viðmiðunarmörk			

2.8. **Innbyggt greiningarkerfi**

Auðkenni hóps	:	
Sjá skýrslu eða skýrslur hóps	:	

2.9. **Prófun á reykþéttni (b)**

2.9.1. *PRÓFUN Á JÖFNUM HRAÐA*

Sjá skýrslu eða skýrslur hóps	:	

2.9.2. *HRÖÐURNARPRÓFUN*

Mælt gleypnigildi (m^{-1})	:	
Leiðrétt gleypnigildi (m^{-1})	:	

2.10. **Hreyfilafl**

Sjá skýrslu eða skýrslur eða viðurkenningarnúmer	:	

2.11. **Upplýsingar um hitastig í tengslum við hálosandi ökutæki**

Verstu hugsanlegu tilfelli við kælingu ökutækis	:	já/nei ([7])
ATCT-hópur sem samanstendur af einum brúunarhópi	:	já/nei ([7])
Hitastig kælivökva hreyfils við lok varma-jafnvægistíma (°C)	:	
Meðalhiti varmajafnvægissvæðis síðustu 3 klst. (°C)	:	
Mismunur á endanlegu hitastigi kælivökva hreyfils og meðalhita varmajafnvægissvæðis síðustu 3 klukkustundir Δ_{T_ATCT} (°C):	:	
Lágmarksvarmajafnvægistími t_{soak_ATCT} (s)	:	
Staðsetning hitaskynjara	:	
Mældur hiti hreyfils	:	olía/kælivökvi

([7]) síðustu sex línurnar eiga ekki við ef svarið er "já“

Viðaukar við prófunarskýrsluna

(á ekki við um ATCT-prófanir og hrein rafökutæki)

1. Öll ílagsgögn fyrir fylgnitólið sem eru talin upp í lið 2.4 í I. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1152 og (ESB) 2017/1153 (reglugerðirnar um fylgnibreytur (e. *Correlation Regulations*)).

   og

   Tilvísun ílagsskrár: …

2. Fullgerð fylgniskrá sem um getur í lið 3.1.1.2 í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2017/1152 og (ESB) 2017/1153:

3. Hreint brunahreyfilsökutæki og tvinnrafökutæki sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu

Niðurstöður á NEDC-fylgni		hálosandi ökutæki	láglosandi ökutæki
Yfirlýst NEDC-gildi koltvísýrings		xxx,xx	xxx,xx
Niðurstöður vegna koltvísýrings CO_2MPAS (þ.m.t. Ki)		xxx,xx	xxx,xx
Niðurstöður vegna koltvísýrings úr tvöfaldri prófun eða handahófskenndri prófun (þ.m.t. Ki)		xxx,xx	xxx,xx
Tætinúmer			
Handahófskennd niðurstaða			
Frávikstuðull (gildi eða á ekki við)			
Sannprófunarstuðull (0/1/á ekki við)			
Yfirlýst gildi staðfest með (CO_2MPAS/tvöfaldri prófun)			
Niðurstöður vegna koltvísýrings CO_2MPAS (að undanskildu Ki)	í þéttbýli		
	utan þéttbýlis		
	blandaður akstur		

Niðurstöður úr raunmælingu

Dagsetning prófunar (s)	Prófun 1		dd/mm/áááá	dd/mm/áááá
	Prófun 2			
	Prófun 3			
Samanlögð koltvísýringslosun	Prófun 1	í þéttbýli	xxx,xxx	xxx,xxx
		utan þéttbýlis	xxx,xxx	xxx,xxx
		blandaður akstur	xxx,xxx	xxx,xxx
	Prófun 2	í þéttbýli		
		utan þéttbýlis		
		blandaður akstur		
	Prófun 3	í þéttbýli		
		utan þéttbýlis		
		blandaður akstur		

Niðurstöður á NEDC-fylgni			hálosandi ökutæki	láglosandi ökutæki
Ki CO_2			1,xxxx	
Samanlögð koltvísýrings-losun þ.m.t. Ki	Meðaltal	blandaður akstur		
Samanburður við yfirlýst gildi (yfirlýst-meðaltal)/yfirlýst %				

Gildi ökumótstöðu fyrir prófun

f_0 (N)		x,x	x,x
f_1 (N/(km/klst.))		x,xxx	x,xxx
f_2 (N/(km/klst.)^2)		x,xxxxx	x,xxxxx
tregðuflokkur (kg)			

Endanlegar niðurstöður

NEDC-koltvísýringur (g/km)	í þéttbýli	xxx,xx	xxx,xx
	utan þéttbýlis	xxx,xx	xxx,xx
	blandaður akstur	xxx,xx	xxx,xx
NEDC FC (l/100km)	í þéttbýli	x,xxx	x,xxx
	utan þéttbýlis	x,xxx	x,xxx
	blandaður akstur	x,xxx	x,xxx

4. Prófunarraðir fyrir tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

4.1. Hálosandi ökutæki

4.1.1. Massalosun koltvísýrings frá tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt (þ.m.t. Ki)
Ki CO_2	1,xxxx
$M_{CO2,NEDC\_H,test,condition\ A}$	
$M_{CO2,NEDC\_H,test,condition\ B}$	
$M_{CO2,NEDC\_H,test,weighted}$	

4.1.2. Raforkunotkun tvinnrafökutækis sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Raforkunotkun (Wh/km)	Samanlagt
$EC_{NEDC\_H,test,condition\ A}$	
$EC_{NEDC\_H,test,condition\ B}$	
$EC_{NEDC\_H,test,weighted}$	

4.1.3. Eldsneytisnotkun (l/100 km)

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Samanlagt
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$FC_{NEDC\_L,test,weighted}$	

4.2. Láglosandi ökutæki (ef við á)

4.2.1. Massalosun koltvísýrings frá tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt (þ.m.t. Ki)
Ki CO_2	1,xxxx
$M_{CO2,NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$M_{CO2,NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$M_{CO2,NEDC\_L,test,weighted}$	

4.2.2. Raforkunotkun tvinnrafökutækis sem er ætlað fyrir ytri hleðslu

Raforkunotkun (Wh/km)	Samanlagt
$EC_{NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$EC_{NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$EC_{NEDC\_L,test,weighted}$	

4.2.3. Eldsneytisnotkun (l/100 km)

Eldsneytisnotkun (l/100 km)	Samanlagt
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ A}$	
$FC_{NEDC\_L,test,condition\ B}$	
$FC_{NEDC\_L,test,weighted}$	

II. HLUTI

Eftirfarandi upplýsingar, ef við á, eru lágmarksgögn sem krafist er við ATCT-prófun

Númer skýrslu

UMSÆKJANDI			
Framleiðandi			
VIÐFANGSEFNI	…		
Auðkenni ökumótstöðuhóps eða ökumótstöðuhópa		:	
Auðkenni brúunarhóps eða brúunarhópa		:	
ATCT-auðkenni		:	

Prófaður hlutur

	Tegund	:	
	Auðkenni brúunarhóps	:	

NIÐURSTAÐA	Hlutur sem var lagður fram til prófunar uppfyllir kröfurnar sem um getur í liðnum „Viðfangsefni.“

STAÐUR,	dd/mm/áááá

Almennar athugasemdir:

Ef nokkrir valkostir (tilvísanir) eru fyrir hendi, ætti að lýsa þeim sem prófaður er í prófunarskýrslunni.

Ef slíkt er ekki fyrir hendi getur ein tilvísun í upplýsingaskjalið í upphafi prófunarskýrslunnar verið fullnægjandi.

Sérhverri tækniþjónustu er frjálst að leggja fram viðbótarupplýsingar.

a) Sérstakar upplýsingar varðandi hreyfla með rafkveikju

b) Sérstakar upplýsingar varðandi þjöppukveikjuhreyfla

1. **LÝSING Á PRÓFUNARÖKUTÆKI**

1.1. ALMENNT

Númer ökutækis	:	Númer frumgerðar og verksmiðjunúmer ökutækis
Flokkur	:	
Fjöldi sæta, að ökumannssæti meðtöldu	:	
Yfirbygging	:	
Knúin hjól	:	

1.1.1. Uppbygging aflrásar

Uppbygging aflrásar	:	hreinn brunahreyfill, tvinn-, rafmagns- eða efnarafali

1.1.2. BRUNAHREYFILL (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvern brunahreyfil umfram einn

Tegund	:					
Gerð	:					
Vinnsluháttur	:	tvígengis-/fjórgengishreyfill				
Fjöldi og fyrirkomulag strokka	:	…				
Slagrými hreyfils (cm^3)	:					
Snúningshraði hreyfils í lausagangi ($mín^{-1}$)	:		±			
Mikill snúningshraði hreyfils í lausagangi ($mín^{-1}$) (a)	:		±			
Málafl hreyfils	:		kW	við		snún./mín.
Hámarkssnúningsvægi (nettó)	:		Nm	við		snún./mín.
Smurolía fyrir hreyfla	:	tegund og gerð				
Kælikerfi	:	Gerð: loft/vatn/olía				
Einangrun	:	efni, magn, staðsetning, rúmmál og þyngd				

1.1.3. PRÓFUNARELDSNEYTI fyrir prófun 1 (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvert prófunareldsneyti umfram eitt

Tegund	:	
Gerð	:	E10 bensín – B7 dísilolía – fljótandi jarðolíugas – jarðgas – …
Eðlismassi við 15 °C	:	
Brennisteinsinnihald	:	Eingöngu fyrir B7 dísilolíu og E10 bensín
IX. viðauki	:	
Númer framleiðslulotu	:	
Willans-stuðlar (fyrir brunahreyfil) fyrir koltvísýringslosun (gCO_2/MJ)	:	

1.1.4. ELDSNEYTISGJAFARKERFI (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvert eldsneytisgjafarkerfi umfram eitt

Bein innsprautun	:	já/nei eða lýsing
Ökutæki eftir tegund eldsneytis	:	Einseldsneytisökutæki, tvíeldsneytisökutæki, ökutæki knúið fjölblöndueldsneyti
Stýrieining		
Hlutatilvísun	:	sama og í upplýsingaskjali
Hugbúnaðarprófun	:	lesið með skönnunartæki, til dæmis
Loftstreymismælir	:	
Spjaldhús	:	
Þrýstiskynjari	:	
Innsprautunardæla	:	
Innsprautunarloki(-lokar) með dælu	:	

1.1.5. INNTAKSKERFI (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvert inntakskerfi umfram eitt

Forþjappa	:	Já/nei tegund & gerð (1)
Millikælir	:	já/nei gerð (loft/loft-loft/vatn) (1)
Loftsía (hlutur) (1)	:	tegund & gerð
Inntakshljóðdeyfir (1)	:	tegund & gerð

1.1.6. ÚTBLÁSTURSKERFI OG KERFI TIL VARNAR UPPGUFUN (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvert kerfi umfram eitt

Fyrri hvarfakútur	:	tegund & tilvísun (1) vinnsluháttur: þrívirkur/oxandi/NO_x-gildra/NO_x-geymslukerfi/valvís, hvötuð afoxun…

Seinni hvarfakútur	:	tegund & tilvísun (1) vinnsluháttur: þrívirkur/oxandi/NO_x-gildra/NO_x-geymslukerfi/valvís, hvötuð afoxun…
Agnasía	:	með/án/á ekki við hvötuð: já/nei tegund & tilvísun (1)
Tilvísun og staðsetning súrefnisskynjara	:	framan við hvata/aftan við hvata
Loftinndæling	:	með/án/á ekki við
Útblástursshringrás	:	með/án/á ekki við kæld/ókæld Háþrýstingur/lágþrýstingur
Mengunarvarnarkerfi fyrir losun við uppgufun	:	með/án/á ekki við
Tilvísun og staðsetning NO_x-skynjara	:	framan við/aftan við
Almenn lýsing (1)	:	

1.1.7. VARMAGEYMSLUBÚNAÐUR (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvern varmageymslubúnað umfram einn

Varmageymslubúnaður	:	já/nei
Varmarýmd (geymt vermi J)	:	
Tími hitalosunar (s)	:	

1.1.8. GÍRSKIPTING (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hverja gírskiptingu umfram eina

Gírkassi	:	beinskiptur/sjálfskiptur/stiglaus breyting
Aðferð við gírskiptingu		
Aðalhamur	:	já/nei venjulegur/akstur/vistvænn/…
Besti hamur að því er varðar koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun (ef við á)	:	
Versti hamur að því er varðar koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun (ef við á)	:	
Stýrieining	:	
Smurolía fyrir gírkassa	:	tegund og gerð
Hjólbarðar		
Tegund	:	
Gerð	:	
Stærð að framan/aftan	:	
Virkt veltiummál í akstri (m)	:	
Loftþrýstingur í hjólbörðum (kPa)	:	

Yfirfærsluhlutfall, fyrsta hlutfall og (hraði ökutækis (km/klst.)/(snúningshraði hreyfils (1000 ($mín^{-1}$)) (V_{1000}) fyrir hvert gírhlutfall.

Gírhlutfall	Fyrsta hlutfall	Yfirfærsluhlutfall	V_{1000}
Fyrsta	1/1		
Annað	1/1		
Þriðja	1/1		
Fjórða	1/1		
Fimmta	1/1		
…			

1.1.9. RAFVÉL (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hverja rafvél umfram eina

Tegund	:	
Gerð	:	
Toppgildi afls (kW)	:	

1.1.10 ENDURHLAÐANLEG RAFORKUGEYMSLUKERFI MEÐ DRIFRAFGEYMI (ef við á)

Endurtakið liðinn fyrir hvert endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi með drifrafgeymi umfram eitt

Tegund	:	
Gerð	:	
Rúmtak (Ah)	:	
Málspenna (V)	:	

1.1.11. AFLRAFEINDATÆKNI (ef við á)

Getur verið fleiri en ein mismunandi aflrafeindatækni (knúningsorkubreytir, lágspennukerfi eða hleðslutæki)

Tegund	:	
Gerð	:	
Afl (kW)	:	

1.2. LÝSING Á ÖKUTÆKI

1.2.1. MASSI

Prófunarmassi hálosandi ökutækis (kg)	:	

1.2.2. MÆLIÞÆTTIR FYRIR ÖKUMÓTSTÖÐU

f_0 (N)	:	
f_1 (N/(km/klst.))	:	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	:	
f_{2_TReg} (N/(km/klst.)^2)	:	
Orkuþörf í lotu (J)	:	

Tilvísun í prófunarskýrslu fyrir ökumótstöðu	:	
Auðkenni ökumótstöðuhóps	:	

1.2.3. MÆLIÞÆTTIR FYRIR VAL Á LOTU

Lota (án niðurskölunar)	:	Flokkur 1/2/3a/3b
Hlutfall nafnafls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs (PMR)(W/kg)	:	(ef við á)
Ferli sem hefur efri hraðamörk meðan á mælingum stendur	:	já/nei
Hámarkshraði ökutækisins (km/klst.)	:	
Niðurskölun (ef við á)	:	já/nei
Niðurskölunarstuðull fdsc	:	
Vegalengd lotu (m)	:	
Jafnhraði (ef um er að ræða stytt prófunarferli)	:	ef við á

1.2.4. GÍRSKIPTIPUNKTUR (EF VIÐ Á)

Útgáfa útreiknings á gírskiptingu		(tilgreina skal viðeigandi breytingu á reglugerð (ESB) 2017/1151)
Gírskipting	:	Meðalgír fyrir $v \geq 1$ km/klst., námundað að fjórum aukastöfum

nmin drive

Fyrsti gír:	:	…mín^{-1}
Fyrsti gír í annan gír	:	…mín^{-1}
Annar gír í kyrrstöðu	:	…mín^{-1}
Annar gír	:	…mín^{-1}
Þriðji gír og ofar	:	…mín^{-1}
Fyrsta gír sleppt	:	já/nei
n_95_high fyrir hvern gír	:	…mín^{-1}
n_min_drive_set í hröðunarfösum/fösum við stöðugan hraða (n_min_drive_up)	:	…mín^{-1}
n_min_drive_set í hraðaminnkunarfösum (nmin_ drive_down)	:	…mín^{-1}
t_start_phase	:	...s
n_min_drive_start	:	…mín^{-1}
n_min_drive_up_start	:	…mín^{-1}
notkun ASM	:	já/nei
ASM-gildi:	:	

2. **NIÐURSTÖÐUR PRÓFANA**

Aðferð við stillingu vegkeflis	:	ekið með fastri stillingu/ítrunaraðferð/annars konar aðferð með eigin upphitunarlotu
Aflmælir í notkun með tvíhjóladrifi/fjórhjóladrifi	:	Tvíhjóladrif/fjórhjóladrif
Snerist ásinn sem er ekki með afl við notkun með tvíhjóladrifi	:	Já/nei/á ekki við
Notkunarhamur aflmælis		já/nei
Fríhjólunarhamur	:	já/nei

2.1 PRÓFUN VIÐ 14 °C

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staðsetning prófunar	:	
Hæð neðri brúnar kæliviftu frá jörðu (cm)	:	
Hliðarstaða miðju viftunnar (ef breytt að ósk framleiðanda)	:	á miðlínu ökutækis/...
Fjarlægð frá framenda ökutækisins (cm)	:	
IWR: Mat á tregðuvinnu (e. *Inertial Work Rating*) (í %)	:	x,x
RMSSE: Kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika (e. *Root Mean Squared Speed Error*) (í km/klst.)	:	x,xx
Lýsing á samþykktu fráviki frá akstursslotu	:	Eldsneytisfetill stiginn í botn

2.1.1. Losun mengandi efna frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Mæligildi							
Viðmiðunarmörk							

2.1.2. Koltvísýringslosun við frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar

Koltvísýringslosun (g/km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Mæligildi $M_{CO2,p,1}$					—
Gildi $M_{CO2,p,1b}$ / $M_{CO2,c,2}$ leiðrétt út frá mældum hraða og vegalengd					
Leiðréttingarstuðull fyrir hleðslujafn-vægi endurhlaðanlegs raforkugeymslu-kerfis ([2])					
$M_{CO2,p,3}$ / $M_{CO2,c,3}$					

([2]) leiðrétting eins og um getur í 2. viðbæti við 6. undirviðauka í XXI. viðauka þessarar reglugerðar fyrir ökutæki með brunahreyfil, K_{CO2} fyrir tvinnrafökutæki

2.2 PRÓFUN VIÐ 23 °C

Veita skal upplýsingar eða vísa til prófunarskýrslu úr prófun 1

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)

Staðsetning prófunar	:	
Hæð neðri brúnar kæliviftu frá jörðu (cm)	:	
Hliðarstaða miðju viftunnar (ef breytt að ósk framleiðanda)	:	á miðlínu ökutækis/...
Fjarlægð frá framenda ökutækisins (cm)	:	
IWR: Mat á tregðuvinnu (e. *Inertial Work Rating*) (í %)	:	x,x
RMSSE: Kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika (e. *Root Mean Squared Speed Error*) (í km/klst.)	:	x,xx
Lýsing á samþykktu fráviki frá aksturslotu	:	Eldsneytisfetill stiginn í botn

2.2.1. Losun mengandi efna frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar

Mengunarefni	Kolsýringur	THC (a)	NMHC (a)	Köfnunar-efnisoxíð (NO_x)	THC + NO_x (b)	Agnamassi	Fjöldi agna
	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(mg/km)	(#.10^{11}/km)
Lokagildi							
Viðmiðunarmörk							

2.2.2. Koltvísýringslosun við frá ökutækjum sem eru með a.m.k. einn brunahreyfil, frá tvinnrafökutækjum sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutækjum sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu komi til hleðsluprófunar

Koltvísýringslosun (g/km)	Lág	Miðlungs	Há	Hæsta	Samanlagt
Mæligildi $M_{CO2,p,1}$					—
Gildi $M_{CO2,p,1b}$ / $M_{CO2,c,2}$ leiðrétt út frá mældum hraða og vegalengd					
Leiðréttingarstuðull fyrir hleðslujafn-vægi endurhlaðanlegs raforkugeymslu-kerfis ([2])					
$M_{CO2,p,3}$ / $M_{CO2,c,3}$					

([2]) leiðrétting eins og um getur í 2. viðbæti við 6. undirviðauka við XXI. viðauka við þessa reglugerð fyrir brunahreyfilsökutæki og 2. viðbæti við 8. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 fyrir tvinnrafökutæki (K_{CO2})

2.3 NIÐURSTAÐA

Koltvísýringslosun (g/km)	Samanlagt
ATCT (14 °C) $M_{CO2,Treg}$	
Prófun 1 (23 °C) $M_{CO2,23°}$	
Leiðréttingarstuðull hóps (FCF)	

2.4. HITASTIGSUPPLÝSINGAR UM VIÐMIÐUNARÖKUTÆKI EFTIR PRÓFUN VIÐ 23 °C

Verstu hugsanlegu tilfelli við kælingu ökutækis	:	já/nei ([3])
ATCT-hópur sem samanstendur af einum brúunarhópi	:	já/nei ([3])
Hitastig kælivökva hreyfils við lok varmajafnvægistíma (°C)	:	
Meðalhiti varmajafnvægissvæðis síðustu 3 klst. (°C)	:	
Mismunur á endanlegu hitastigi kælivökva hreyfils og meðalhita varmajafnvægissvæðis síðustu 3 klukkustundir Δ_{T_ATCT} (°C):	:	
Lágmarksvarmajafnvægistími t_{soak_ATCT} (s)	:	
Staðsetning hitaskynjara	:	
Mældur hiti hreyfils	:	olía/kælivökvi

([3]) síðustu sex línurnar eiga ekki við ef svarið er "já“

8. viðbætir b

Prófunarskýrsla fyrir ökumótstöðu

Eftirfarandi upplýsingar, ef við á, eru lágmarksgögn sem krafist er við prófun til að ákvarða ökumótstöðu.

Númer skýrslu

UMSÆKJANDI			
Framleiðandi			
VIÐFANGSEFNI	Ákvörðun ökumótstöðu ökutækis /...		
Auðkenni ökumótstöðuhóps eða ökumótstöðuhópa		:	
Prófaður hlutur			
	Tegund	:	
	Gerð	:	
NIÐURSTAÐA	Hlutur sem var lagður fram til prófunar uppfyllir kröfurnar sem um getur í liðnum „Viðfangsefni.“		

STAÐUR,	dd/mm/áááá

1. VIÐKOMANDI ÖKUTÆKI

Tegund eða tegundir sem um er að ræða	:	
Gerð eða gerðir sem um er að ræða	:	
Verslunarheiti	:	
Hámarkshraði (km/klst.)	:	
Aflás eða aflásar	:	

2. LÝSING Á PRÓFUNARÖKUTÆKJUM

Ef brúun er ekki gerð skal gefa lýsingu á því ökutæki sem er lakast (að því er varðar orkuþörf)

2.1. Mæling í vindgöngum

Samsetning af	:	flatreim eða vegkefli

2.1.1. Almenn atriði

	Vindgöng		Aflmælir	
	H_R	L_R	H_R	L_R
Tegund				
Gerð				
Útfærsla				
Orkuþörf í lotu fyrir heila WLTC-prófunarlotu í flokki 3, (kJ)				
Frávik frá framleiðsluröð	—	—		
Akstursvegalengd (km)	—	—		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Tegund	:	
Gerð	:	
Útfærsla	:	
Orkuþörf í lotu fyrir heila WLTC-prófunarlotu (kJ)	:	
Frávik frá framleiðsluröð	:	
Akstursvegalengd (km)	:	

2.1.2. Massar

	Aflmælir	
	H_R	L_R
Prófunarmassi (kg)		
Meðalmassi m_{av} (kg)		
Gildi fyrir m_r (kg á hverjum ás)		
Ökutæki í flokki M: hlutfall af massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás (%)		
Ökutæki í flokki N: þyngdardreifing (kg eða %)		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Prófunarmassi (kg)	:	
Meðalmassi mav (kg)	:	(meðaltal fyrir og eftir prófun)
Tæknilega leyfilegur hámarksmassi með hleðslu	:	
Áætlað meðalgildi fyrir massa aukabúnaðar	:	
Ökutæki í flokki M: hlutfall af massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás (%)	:	
Ökutæki í flokki N: þyngdardreifing (kg eða %)	:	

2.1.3. Hjólbarðar

	Vindgöng		Aflmælir	
	H_R	L_R	H_R	L_R
Stærðarmerking				
Tegund				
Gerð				

	Vindgöng		Aflmælir	
	H_R	L_R	H_R	L_R
Snúningsmótstaða				
Framás (kg/t)	—	—		
Afturás (kg/t)	—	—		
Þrýstingur í hjólbörðum				
Framás (kPa)	—	—		
Afturás (kPa)	—	—		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Stærðarmerking		
Tegund	:	
Gerð	:	
Snúningsmótstaða		
Framás (kg/t)	:	
Afturás (kg/t)	:	
Þrýstingur í hjólbörðum		
Framás (kPa)	:	
Afturás (kPa)	:	

2.1.4. Yfirbygging

	Vindgöng	
	H_R	L_R
Gerð	AA/AB/AC/AD/AE/AF BA/BB/BC/BD	
Útfærsla		
Búnaður sem dregur úr loftnúningsviðnámi		
Hreyfanlegir hlutar yfirbyggingar sem draga úr loftnúningsviðnámi	j/n og skrá, ef við á	
Skrá yfir uppsetta valkosti sem draga úr loftnúnings-viðnámi		
Delta $(C_D \times A_f)_{LH}$ borið saman við H_R (m^2)	—	

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Lýsing á lögun yfirbyggingar	:	Ferhyrndur kassi (ef ekki er hægt að ákvarða dæmigerða lögun yfirbyggingar fullbúins ökutækis)
Framhlið, Afr (m^2)	:	

2.2. Á VEGUM

2.2.1. Almenn atriði

	H_R	L_R
Tegund		
Gerð		
Útfærsla		
Orkuþörf í lotu fyrir heila WLTC-prófunarlotu í flokki 3, (kJ)		
Frávik frá framleiðsluröð		
Akstursvegalengd		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Tegund	:	
Gerð	:	
Útfærsla	:	
Orkuþörf í lotu fyrir heila WLTC-prófunarlotu (kJ)	:	
Frávik frá framleiðsluröð	:	
Akstursvegalengd (km)	:	

2.2.2. Massar

	H_R	L_R
Prófunarmassi (kg)		
Meðalmassi m_{av} (kg)		
Gildi fyrir m_r (kg á hverjum ás)		
Ökutæki í flokki M: hlutfall af massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás (%)		
Ökutæki í flokki N: þyngdardreifing (kg eða %)		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Prófunarmassi (kg)	:	
Meðalmassi mav (kg)	:	(meðaltal fyrir og eftir prófun)
Tæknilega leyfilegur hámarksmassi með hleðslu	:	
Áætlað meðalgildi fyrir massa aukabúnaðar	:	
Ökutæki í flokki M: hlutfall af massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás (%)		
Ökutæki í flokki N: þyngdardreifing (kg eða %)		

2.2.3. Hjólbarðar

	H_R	L_R
Stærðarmerking		
Tegund		
Gerð		
Snúningsmótstaða		
Framás (kg/t)		
Afturás (kg/t)		
Þrýstingur í hjólbörðum		
Framás (kPa)		
Afturás (kPa)		

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Stærðarmerking	:	
Tegund	:	
Gerð	:	
Snúningsmótstaða		
Framás (kg/t)	:	
Afturás (kg/t)	:	
Þrýstingur í hjólbörðum		
Framás (kPa)	:	
Afturás (kPa)	:	

2.2.4. Yfirbygging

	H_R	L_R
Gerð	AA/AB/AC/AD/AE/AF BA/BB/BC/BD	
Útfærsla		
Búnaður sem dregur úr loftnúningsviðnámi		
Hreyfanlegir hlutar yfirbyggingar sem draga úr loftnúningsviðnámi	j/n og skrá, ef við á	
Skrá yfir uppsetta valkosti sem draga úr loftnúnings-viðnámi		
Delta $(C_D \times A_f)_{LH}$ borið saman við H_R (m^2)	—	

Eða (ef um ræðir ökumótstöðufylkjahóp):

Lýsing á lögun yfirbyggingar	:	Ferhyrndur kassi (ef ekki er hægt að ákvarða dæmigerða lögun yfirbyggingar fullbúins ökutækis)
Framhlið, A_{fr} (m^2)	:	

2.3. AFLRÁS

2.3.1. Hálosandi ökutæki

Hreyfilkóði	:	
Gerð gírskiptingar	:	beinskipt, sjálfskipt eða samfelld, stiglaus skipting
Tegund gírkassa (kóðar framleiðanda)	:	(málgildi snúningsvægis og fjöldi tengsla skulu skrásett í upplýsingaskjal)
Tegundir gírskiptinga (kóðar framleiðanda)	:	

Snúningshraði hreyfils deilt með hraða ökutækis	:	Gír	Gírhlutföll	Hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis
		Fyrsta	1/..	
		Annað	1..	
		Þriðja	1/..	
		Fjórða	1/..	
		Fimmta	1/..	
		Sjötta	1/..	
		..		
		..		

Rafvél eða -vélar í hlutlausum gír	:	á ekki við (rafvél ekki fyrir hendi eða enginn fríhjólunarhamur)
Gerð og fjöldi rafvéla	:	gerð smíði: ósamstillt/samstillt...
Gerð kælivökva	:	loft, vökvi,...

2.3.2. Láglosandi ökutæki

Endurtakið lið 2.3.1 með gögnum láglosandi ökutækis

2.4. NIÐURSTÖÐUR PRÓFANA

2.4.1. Hálosandi ökutæki

Prófunardagsetningar	:	dd/mm/áááá (vindgöng) dd/mm/áááá (aflmælir) eða dd/mm/áááá (á vegum)

Á VEGUM

Prófunaraðferð	:	fríhjólun eða aðferð með snúningsvægismæli
Starfsstöð (heiti/staðsetning/tilvísun prófunarbrautar)	:	
Fríhjólunarhamur	:	j/n
Hjólastaða	:	Gildi fyrir hjólastefnu og hjólhalla
Hámarksviðmiðunarhraði (km/klst.)	:	

Vindmælingar	:	í kyrrstöðu eða um borð: áhrif vindmælinga ($C_D \times A$) og hvort hafi verið leiðrétt fyrir þeim.
Fjöldi skiptinga	:	
Vindorka	:	miðlungs, toppar og vindátt í tengslum við stefnu prófunarbrautar
Loftþrýstingur	:	
Hiti (meðalgildi)	:	
Vindleiðrétting	:	j/n
Aðlögun loftþrýstings í hjólbörðum	:	j/n
Óunnar niðurstöður	:	Aðferð snúningsvægis: c_0 = c_1 = c_2 = Fríhjólunaraðferð: f_0 f_1 f_2
Endanlegar niðurstöður		Aðferð snúningsvægis: c_0 = c_1 = c_2 = og f_0 = f_1 = f_2 = Fríhjólunaraðferð: f_0 = f_1 = f_2 =

Eða

AÐFERÐ MEÐ VINDGÖNGUM

Starfsstöð (heiti/staðsetning/tilvísun aflmælis)	:	
Hæfi starfsstöðva	:	Tilvísun og dagsetning skýrslu
Aflmælir		
Gerð aflmælis	:	flatreim eða vegkefli
Aðferð	:	stöðugur hraði eða hraðaminnkun
Upphitun	:	upphitun á vegkefli eða við akstur ökutækis
Leiðrétting á kúrfu keflis	:	(fyrir vegkefli, ef við á)
Stilling vegkeflis	:	ekið með fastri stillingu/ítrunaraðferð/annars konar aðferð með eigin upphitunarlotu

Mældur loftnúningsviðnámsstuðull margfaldaður með framhlið	:	Hraði (km/klst.)	$C_D \times A$ (m^2)
		…	…
		…	…
Niðurstöður	:	f_0 = f_1 = f_2 =	

Eða

ÖKUMÓTSTÖÐUFYLKI Á VEGI

Prófunaraðferð	:	fríhjólun eða aðferð með snúningsvægismæli
Starfsstöð (heiti/staðsetning/tilvísun prófunarbrautar)	:	
Fríhjólunarhamur	:	j/n
Hjólastaða	:	Gildi fyrir hjólastefnu og hjólhalla
Hámarksviðmiðunarhraði (km/klst.)	:	
Vindmælingar	:	í kyrrstöðu eða um borð: áhrif vindmælinga ($C_D \times A$) og hvort hafi verið leiðrétt fyrir þeim.
Fjöldi skiptinga	:	
Vindorka	:	miðlungs, toppar og vindátt í tengslum við stefnu prófunarbrautar
Loftþrýstingur	:	
Hiti (meðalgildi)	:	
Vindleiðrétting	:	j/n
Aðlögun loftþrýstings í hjólbörðum	:	j/n
Óunnar niðurstöður	:	Aðferð snúningsvægis: c_{0r} = c_{1r} = c_{2r} = Fríhjólunaraðferð: f_{0r} = f_{1r} = f_{2r} =
Endanlegar niðurstöður		Aðferð snúningsvægis: c_{0r} = c_{1r} = c_{2r} = og f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) =

		f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) = Fríhjólunaraðferð: f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) = f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) =

Eða

AÐFERÐ MEÐ ÖKUMÓTSTÖÐUFYLKI Í VINDGÖNGUM

Starfsstöð (heiti/staðsetning/tilvísun aflmælis)	:		
Hæfi starfsstöðva	:	Tilvísun og dagsetning skýrslu	
Aflmælir			
Gerð aflmælis	:	flatreim eða vegkefli	
Aðferð	:	stöðugur hraði eða hraðaminnkun	
Upphitun	:	upphitun á vegkefli eða við akstur ökutækis	
Leiðrétting á kúrfu keflis	:	(fyrir vegkefli, ef við á)	
Stilling vegkeflis	:	ekið með fastri stillingu/ítrunaraðferð/annars konar aðferð með eigin upphitunarlotu	
Mældur loftnúningsviðnámsstuðull margfaldaður með framhlið	:	Hraði (km/klst.)	$C_D \times A$ (m^2)
		…	…
		…	…
Niðurstöður	:	f_{0r} = f_{1r} = f_{2r} = f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki H_M) = f_{0r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) = f_{2r} (reiknað út fyrir ökutæki L_M) =	

2.4.2. Láglosandi ökutæki

Endurtakið lið 2.4.1 með gögnum fyrir láglosandi ökutæki

———

8. viðbætir c

Sniðmát fyrir prófunarblað

Á prófunarblaðinu skulu vera prófunargögn sem eru skrásett en eru ekki í neinum prófunarskýrslum.

Geyma skal prófunarblaðið eða -blöðin hjá tækniþjónustu eða framleiðanda í a.m.k. 10 ár.

Eftirfarandi upplýsingar, ef við á, eru lágmarksgögn sem er krafist fyrir prófunarblöð.

Upplýsingar úr 4. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151			
Stillanlegir mæliþættir fyrir hjólastöðu	:		
Reiknistuðlarnir c_0, c_1 og c_2,	:	c_0 = c_1 = c_2 =	
Fríhjólunartími mældur á vegkeflinu	:	Viðmiðunarsnúningshraði (km/klst.)	Fríhjólunartími (s)
		130	
		120	
		110	
		100	
		90	
		80	
		70	
		60	
		50	
		40	
		30	
		20	
Koma má viðbótarþyngd fyrir á eða í ökutækinu til að koma í veg fyrir að hjólbarði renni til	:	þyngd (kg) í/á ökutæki	
Fríhjólunartími að lokinni fríhjólun ökutækis	:	Viðmiðunarsnúningshraði (km/klst.)	Fríhjólunartími (s)
		130	
		120	
		110	
		100	
		90	
		80	
		70	
		60	
		50	
		40	
		30	
		20	

Upplýsingar úr 5. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151		
Skilvirkni NO_x-breytis Tilgreindur styrkur a, b, c, d og styrkurinn þegar NO_x-greiningartækið er stillt á NO-ham til að kvörðunargasið fari ekki í gegnum breytinn	:	(a) = (b) = (c) = (d) = Styrkur í NO-ham =
Upplýsingar úr 6. undirviðauka við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151		
Vegalengdin sem er raunverulega ekin	:	
Ökutæki með handskiptingu sem ekki geta fylgt ferli akstursslotu: Frávik frá akstursslotu	:	
Stuðlar akstursferlis: Eftirfarandi stuðlar skulu reiknaðir út í samræmi við staðalinn SAE J2951 (endurskoðaður í janúar 2014): IWR: Mat á tregðuvinnu (e. *Inertial Work Rating*) RMSSE: Kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika (e. *Root Mean Squared Speed Error*)	: : : : : :	
Vigtun agnasýnatökusía Sía fyrir prófun Sía eftir prófun Viðmiðunarsía	: : :	
Innihald hvers efnasambands mælt eftir stöðgun mælitækisins	:	
Ákvörðun endurnýjunarstuðla Fjöldi lota D milli tveggja WLTC-prófunarlota þar sem endurnýjun á sér stað Fjöldi lota þar sem losunarmælingar eiga sér stað (n) Mæling á massa losunar M'_{sij} fyrir hvert efnasamband i í hverri lotu j	: : :	
Ákvörðun endurnýjunarstuðla Fjöldi viðeigandi prófunarlota (d) sem mældar eru fyrir algjöra endurnýjun	:	
Ákvörðun endurnýjunarstuðla Msi Mpi Ki	: : :	
Upplýsingar úr 6. undirviðauka a við XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151		
ATCT Mæla skal lofthita og raka í prófunarklefanum við úttak kæliviftu ökutækis með 0,1 Hz lágmarkstíðni.	:	Hitastig stillipunkts = T_{reg} Gildi raunhitastigs ± 3°C við upphaf prófunar ± 5 °C meðan á prófun stendur
Stöðug mæling á hitastigi varmajafnvægissvæðis á 0,033 Hz lágmarkstíðni.	:	Hitastig stillipunkts = T_{reg} Gildi raunhitastigs ± 3°C við upphaf prófunar ± 5 °C meðan á prófun stendur

Tími flutnings úr formeðhöndlun á varmajafnvægissvæði	:	≤ 10 mínútur
Tíminn milli loka prófunar 1 og kælingarferlisins	:	≤ 10 mínútur
Mældur varmajafnvægistími skal skráður á öll viðeigandi prófunarblöð.	:	tímabil milli mælingar á endanlegu hitastigi og endaloka prófunar 1 við 23°C

Upplýsingar úr VI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151

Sólarhringsprófun Umhverfishiti við tvær lotur af sólarhringsprófun (skráð a.m.k. á hverri mínútu)	:	
Hleðsla hylkis vegna blásturstaps Umhverfishiti við fyrsta 11 klukkustunda sniðið (skráð a.m.k. á tíu mínútna fresti)	:“.	

29) Eftirfarandi 8. viðbætir d bætist við:

„8. viðbætir d

Prófunarskýrsla úr prófun á losun við uppgufun

Eftirfarandi upplýsingar, ef við á, eru lágmarksgögn sem krafist er við prófun á losun við uppgufun.

Númer SKÝRSLU

UMSÆKJANDI			
Framleiðandi			
VIÐFANGSEFNI	…		
Auðkenni hóps varðandi losun við uppgufun		:	

Prófaður hlutur

	Tegund	:	
NIÐURSTAÐA	Hlutur sem var lagður fram til prófunar uppfyllir kröfurnar sem um getur í liðnum „Viðfangsefni.“		

STAÐUR,	dd/mm/áááá

Sérhverri tækniþjónustu er frjálst að leggja fram viðbótarupplýsingar

1. LÝSING Á HÁLOSANDI PRÓFUNARÖKUTÆKI

Númer ökutækis	:	Númer frumgerðar og verksmiðjunúmer ökutækis
Flokkur	:	

1.1. **Uppbygging aflrásar**

Uppbygging aflrásar	:	bruna-, tvinn-, rafmagns- eða efnarafali

1.2. **Brunahreyfill**

Endurtakið liðinn fyrir hvern brunahreyfil umfram einn

Tegund	:	
Gerð	:	
Vinnsluháttur	:	tvígengis-/fjórgengishreyfill
Fjöldi og fyrirkomulag strokka	:	
Slagrými hreyfils (cm^3)	:	
Forþjappa	:	já/nei
Bein innsprautun	:	já/nei eða lýsing
Ökutæki eftir tegund eldsneytis	:	Einseldsneytisökutæki, tvíeldsneytisökutæki, ökutæki knúið fjölblöndueldsneyti
Smurolía fyrir hreyfla	:	Tegund og gerð
Kælikerfi	:	Gerð: loft/vatn/olía

1.4. **Eldsneytiskerfi**

Innsprautunardæla	:	
Innsprautunarloki(-lokar) með dælu	:	
Eldsneytisgeymir		
Lag eða lög	:	einlaga/marglaga
Smíðaefni fyrir eldsneytisgeyminn	:	málmur / …
Smíðaefni fyrir aðra hluta eldsneytiskerfisins	:	…
Innsiglað	:	já/nei
Nafnrúmtak geymis (l)	:	
Hylki		
Tegund og gerð	:	
Gerð af virku kolefni	:	
Magn viðarkola (l)	:	
Massi viðarkola (g)	:	
Yfirlýst vinnslugeta bútans (g)	:	xx,x

2. NIÐURSTÖÐUR PRÓFANA

2.1. **Öldrun hylkis í prófunarbekk**

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staðsetning prófunar	:	
Prófunarskýrsla um öldrunarprófun hylkis	:	
Hleðsluhlutfall	:	
Forskriftir fyrir eldsneyti		
Tegund	:	
Þéttleiki við 15 °C (kg/m^3)	:	

Etanólinnihald (%)	:	
Númer framleiðslulotu	:	

2.2. **Ákvörðun gegndræpistuðuls**

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staðsetning prófunar	:	
Prófunarskýrsla úr prófun á gegndræpistuðli	:	
vetniskolefni sem mælast í viku 3, HC_{3W} (mg/24 klst.)	:	xxx
vetniskolefni sem mælast í viku 20, HC_{20W} (mg/24 klst.)	:	xxx
Gegndræpistuðull, PF (mg/24 klst.)	:	xxx

Ef um ræðir marglaga geyma eða geyma úr málmi

Annar gegndræpistuðull, PF (mg/24 klst.)	:	já/nei

2.3. **Prófun á losun við uppgufun**

Dagsetning prófana	:	(dagur/mán./ár)
Staðsetning prófunar	:	
Aðferð við stillingu vegkeflis	:	ekið með fastri stillingu/ítrunaraðferð/annars konar aðferð með eigin upphitunarlotu
Notkunarhamur aflmælis		já/nei
Fríhjólunarhamur	:	já/nei

2.3.1. **Massi**

Prófunarmassi hálosandi ökutækis (kg)	:	

2.3.2. **Mæliþættir fyrir ökumótstöðu**

f_0 (N)	:	
f_1 (N/(km/klst.))	:	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	:	

2.3.3. **Lota og gírskiptipunktur (ef við á)**

Lota (án niðurskölunar)	:	Flokkur 1/2/3
Gírskipting	:	Meðalgír fyrir $v \geq 1$ km/klst., námundað að fjórum aukastöfum

2.3.4. **Ökutæki**

Prófunarökutæki	:	Hálosandi ökutæki eða lýsing
Akstursvegalengd (km)	:	
Aldur (í vikum)	:	

2.3.5. **Prófunarferli og niðurstöður**

Prófunarferli	:	Samfellt (þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi)/samfellt (eldsneytisgeymiskerfi sem er ekki þéttlokað)/ sjálfstætt (þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi)
Lýsing á tímabilum til að koma á varmajafnvægi (tímalengd og hitastig)	:	
Gildi hleðslu vegna blásturstaps (g)	:	xx,x (ef við á)

Prófun á losun við uppgufun	Varmajafnvægi náð, M_{HS}	Sólarhringsprófun-dagur 1: M_{D1}	Sólarhringsprófun-dagur 2: M_{D2}
Meðalhiti (°C)		—	—
Losun við uppgufun (g/prófun)	x,xxx	x,xxx	x,xxx
Endanlegar niðurstöður, M_{HS} + M_{D1} + M_{D2} + (2xPF) (g/prófun)	x,xx		
Mörk (g/prófun)	2.0“		

II. VIÐAUKI

Ákvæðum II. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Eftirfarandi texti bætist við á eftir fyrirsögninni:

„A-HLUTI“

2) Í stað liðar 1.1 kemur eftirfarandi:

„1.1. Þessi hluti gildir um ökutæki í flokki M og N1, I. undirflokki, sem byggjast á gerðum sem eru viðurkenndar fram til 31. desember 2018 og skráðar fram til 31. ágúst 2019 og um ökutæki í flokki N1, II. og III. undirflokki, og ökutæki í flokki N2 sem byggjast á gerðum sem eru viðurkenndar fram til 31. ágúst 2019 og skráðar fram til 31. ágúst 2020.“

3) Í stað liðar 2.10 kemur eftirfarandi:

„2.10. Í lið 3.2.1, lið 4.2 og neðanmálsgreinum 1 og 2 í 4. viðbæti við reglugerð efnahagsnefndar SÞ fyrir Evrópu nr. 83 skal líta svo á að tilvísunin í viðmiðunarmörkin sem um getur í töflu 1 í lið 5.3.1.4 sé tilvísun í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.“

4) Eftirfarandi bætist við:

„B-HLUTI

NÝ AÐFERÐAFRÆÐI VIÐ ATHUGUN Á SAMRÆMI Í NOTKUN

1. Inngangur

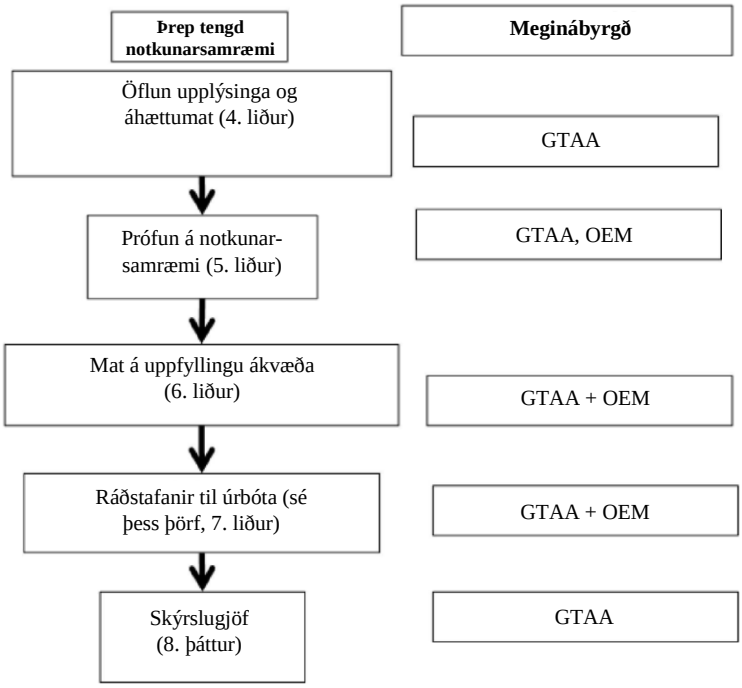
Þessi hluti gildir um ökutæki í flokki M og N1, I. undirflokki, sem byggir á gerðum sem eru viðurkenndar eftir 1. janúar 2019 og um öll ökutæki sem skráð eru eftir 1. september 2019 og um ökutæki í flokki N1, II. og III. undirflokki, og flokki N2 sem byggjast á gerðum sem eru viðurkenndar eftir 1. september 2019 og skráðar eru eftir 1. september 2020.

Í þessum hluta koma fram kröfur um samræmi ökutækja í notkun (e. *in-service conformity, ISC*) við athugun á samræmi við viðmiðunarmörk losunar gegnum útblástursrör (þ.m.t. við lágt hitastig) og losun við uppgufun á eðlilegum endingartíma ökutækisins, allt að fimm árum eða 100 000 km, eftir því hvort ber fyrr að.

2. Ferlislýsing

Mynd B.1

Skýringarmynd af ferlinu við athugun á samræmi ökutækja í notkun (þar sem GTAA vísar til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins sem veitir viðurkenninguna og OEM vísar til framleiðandans)



3. Skilgreining notkunarsamræmishóps

Notkunarsamræmishópur (ISC-hópur) skal samanstanda af eftirfarandi ökutækjum:

a) Vegna losunar gegnum útblástursrör (prófanir 1 og 6), þau ökutæki sem falla undir sama PEMS-prófunarhópinn eins og lýst er í 7. viðbæti III. viðauka A,

b) vegna losunar við uppgufun (prófun 4), þau ökutæki sem tilheyra sama uppgufunarlosunarhópnum (e. *evaporative emission family*) eins og lýst er í lið 5.5 í VI. viðauka.

4. Öflun upplýsinga og upphaflegt áhættumat

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal safna öllum viðeigandi upplýsingum um að hugsanlega sé ekki farið að tilskildum ákvæðum sem skipta máli við ákvörðunina um hvaða ISC-hópar skulu prófaðir á tilteknu ári. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal einkum taka tillit til upplýsinga sem vísa til gerðar ökutækis með mikla losun við raunveruleg akstursskilyrði. Safna skal upplýsingunum með því að notkun viðeigandi aðferðir sem geta falist í fjarkönnun, einfölduðum innbyggðum losunarvöktunarkerfum (SEMS) og prófun með færanlegu mælikerfi fyrir losun (PEMS). Nota má fjölda og vægi þeirra tilvika þar sem staðfest er að farið hafi verið yfir mörk meðan á slíkri prófun stendur til að setja prófanir á samræmi ökutækja í notkun í forgang.

Sérhver framleiðandi skal láta gerðarviðurkenningaryfirvaldinu, sem veitir viðurkenninguna, í té skýrslur um losunartengdar ábyrgðarkröfur og um allar losunartengdar ábyrgðarviðgerðir sem eru gerðar eða skráðar meðan á viðhaldi stendur sem hluta af upplýsingunum sem lagðar eru fram í tengslum við athuganir á samræmi ökutækja í notkun, í samræmi við snið sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, og framleiðandinn koma sér saman um við gerðarviðurkenningu. Í upplýsingunum skal tilgreina tíðni og meginatriði ágalla í íhlutum og kerfum sem tengjast losun, sundurliðað eftir ISC-hópum. Skýrslunum skal skilað a.m.k. einu sinni á ári fyrir hvern notkunarsamræmishóp (e. *ISC-family*) út það tímabil þegar framkvæma á athuganir á notkunarsamræmi í samræmi við 3. mgr. 9. gr.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal, á grundvelli upplýsinganna sem um getur í fyrstu og annarri málsgrein, gera frummat á hættunni á að notkunarsamræmishópur uppfylli ekki reglurnar um samræmi ökutækja í notkun og á þeim grundvelli skal ákveða hvaða hópar skulu prófaðir og hvaða tegundir prófana skulu gerðar samkvæmt ákvæðunum um samræmi ökutækja í notkun. Gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna er enn fremur heimilt að velja ISC-hópa til prófunar af handahófi.

5. Prófun á samræmi ökutækja í notkun

Framleiðandinn skal gera prófanir á samræmi ökutækja í notkun með tilliti til losunar gegnum útblástursrör, sem a.m.k. felur í sér prófun 1 á öllum ISC-hópum. Framleiðandinn getur einnig gert RDE-prófun og prófanir 4 og 6 á öllum ISC-hópum eða hluta þeirra. Framleiðandinn skal láta gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna í té skýrslur um allar niðurstöður prófunarinnar á samræmi ökutækja í notkun í gegnum rafræna vettvanginn fyrir samræmi ökutækja í notkun sem lýst er í lið 5.9.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal athuga viðeigandi fjölda ISC-hópa á hverju ári eins og sett er fram í lið 5.4. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal láta allar niðurstöður úr prófuninni á notkunarsamræmi koma fram á rafræna vettvanginum fyrir notkunarsamræmi sem lýst er í lið 5.9.

Faggiltar rannsóknarstofur eða tækniþjónustur geta framkvæmt athuganir á ótakmörkuðum fjölda af ISC-hópum á hverju ári. Faggiltu rannsóknarstofurnar eða tækniþjónusturnar skulu láta gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna í té skýrslur um allar niðurstöður prófana á samræmi ökutækja í notkun í gegnum rafræna vettvanginn fyrir samræmi ökutækja í notkun sem lýst er í lið 5.9.

5.1. Gæðatrygging á prófunum

Eftirlitsaðilar og rannsóknarstofur sem framkvæma athuganir á samræmi ökutækja í notkun og eru ekki tilnefndar tækniþjónustur skulu hafa faggildingu samkvæmt EN ISO/IEC 17020:2012 vegna prófunaraðferðarinnar fyrir samræmi ökutækja í notkun. Rannsóknarstofur sem framkvæma prófanir á samræmi ökutækja í notkun og eru ekki tilnefndar tækniþjónustur í skilningi 41. gr. tilskipunar 2007/46 geta einungis séð um prófun á samræmi ökutækja í notkun ef þær hafa hlotið faggildingu samkvæmt EN ISO/IEC 17025:2017.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal gera árlega úttekt á þeim athugunum á samræmi ökutækja í notkun sem framleiðandinn framkvæmir. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið getur einnig gert úttekt á þeim athugunum á samræmi ökutækja í notkun sem framkvæmdar eru af faggiltum rannsóknarstofum og tækniþjónustum. Úttektin skal byggjast á þeim upplýsingum sem framleiðendur og faggilt rannsóknarstofa eða tækniþjónusta leggur fram og skal a.m.k. innihalda ítarlegu skýrsluna á samræmi ökutækja í notkun í samræmi við 3. viðbæti. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna getur krafist þess að framleiðendurnir og faggiltu rannsóknarstofurnar eða tækniþjónusturnar leggi fram viðbótarupplýsingar.

5.2. Faggiltar rannsóknarstofur og tækniþjónustur birta niðurstöður úr prófunum

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal tilkynna þeim faggiltu rannsóknarstofum eða tækniþjónustum sem lögðu fram niðurstöður úr prófun á tilteknum ISC-hópi um niðurstöður matsins á uppfyllingu ákvæða og um ráðstafanir til úrbóta að því er varðar þann hóp, um leið og þær liggja fyrir.

Niðurstöður prófananna, þ.m.t. nákvæmu gögnin um öll prófuð ökutæki, má einungis birta opinberlega eftir að gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna hefur birt ársskýrsluna eða niðurstöðurnar úr stakri aðferð við prófun á samræmi ökutækja í notkun eða eftir að tölfræðiferlinu (sjá lið 5.10) er lokið án niðurstöðu. Ef niðurstöður prófananna á samræmi ökutækja í notkun eru birtar skal þeim fylgja tilvísun í þá ársskýrslu gerðarviðurkenningaryfirvaldsins, sem veitir viðurkenninguna sem innihélt þær niðurstöður.

5.3. Tegundir prófana

Prófun á samræmi ökutækja í notkun skal einungis gera á ökutækjum sem valin eru í samræmi við 1. viðbæti.

Prófun á samræmi ökutækja í notkun með prófun 1 skal framkvæma í samræmi við XXI. viðauka.

Prófun á samræmi ökutækja í notkun með RDE-prófunum skal framkvæma í samræmi við III. viðauka A, prófun 4 skal framkvæma í samræmi við 2. viðbæti við þennan viðauka og prófun 6 skal framkvæma í samræmi við VIII. viðauka.

5.4. Tíðni og gildissvið prófunar á samræmi ökutækja í notkun

Ekki skal líða lengra tímabil en 24 mánuðir á milli upphafs tveggja prófana á samræmi ökutækja í tilteknum notkunarsamræmishópi á vegum framleiðanda.

Tíðni prófana á samræmi ökutækja í notkun sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna framkvæmir skal byggjast á aðferðafræði við áhættumat sem samræmist alþjóðlega staðlinum ISO 31000:2018 *Risk management — Principles and Guidelines*, og skal innihalda niðurstöður upphaflega áhættumatsins sem gert er í samræmi við 4. lið.

Frá og með 1. janúar 2020 skulu gerðarviðurkenningaryfirvöld sem veita viðurkenningu framkvæma prófun 1 og RDE-prófun á minnst 5% af ISC-hópum hjá hverjum framleiðanda á ári hverju eða a.m.k. á tveimur ISC-hópum hjá hverjum framleiðanda á ári hverju, ef þeir eru fyrir hendi. Krafan um að prófun sé gerð á minnst 5% af ISC-hópum eða a.m.k. á tveimur slíkum hópum hjá hverjum framleiðanda á ári skal ekki gilda um smærri framleiðendur. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal tryggja að það náist til sem mests úrvals notkunarsamræmishópa og aldursflokka í tilteknum notkunarsamræmishópi til að tryggja að farið sé að ákvæðum 3. mgr. 8. gr. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal ljúka tölfræðiferlinu sem það hefur hafið fyrir hvern notkunarsamræmishóp innan 12 mánaða.

Ekki skal gera neinar lágmarkskröfur um tíðni prófana á notkunarsamræmi með prófunum 4 og 6.

5.5. Fjármögnun prófana á notkunarsamræmi af hálfu gerðarviðurkenningaryfirvalda sem veita viðurkenningu

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal tryggja að nægilegt fjármagn sé tiltækt til að standa straum af kostnaðinum við prófanir á samræmi ökutækja í notkun. Með fyrirvara um landslög skal endurheimta þennan kostnað með gjöldum sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna getur lagt á framleiðandann. Slík gjöld skulu standa straum af prófunum á notkunarsamræmi á allt að 5% af notkunarsamræmishópum hjá hverjum framleiðanda á hverju ári eða á a.m.k. tveimur notkunarsamræmishópum hjá hverjum framleiðanda á hverju ári.

5.6. Prófunaráætlun

Við framkvæmd RDE-prófunar í tengslum við notkunarsamræmi skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna gera drög að prófunaráætlun. Sú áætlun skal m.a. innihalda prófun til að athuga að farið sé að margvíslegum skilyrðum um samræmi ökutækja í akstri í samræmi við III. viðauka A.

5.7. Val á ökutækjum vegna prófunar á notkunarsamræmi

Upplýsingarnar sem er safnað skulu vera nægilega ítarlegar til að tryggja að unnt sé að meta frammistöðu ökutækja í notkun sem er viðhaldið og notuð á tilhlýðilegan hátt. Nota skal töflurnar í 1. viðbæti til að ákveða hvort hægt sé að velja ökutækið til prófunar á notkunarsamræmi. Við samanburðinn við töflurnar í 1. viðbæti getur það gerst að sum ökutækin séu úrskurðuð sem biluð og því ekki prófuð með tilliti til notkunarsamræmis þegar vísbendingar eru um að hlutar mengunarvarnarkerfisins hafi orðið fyrir skemmdum.

Nota má sama ökutækið til að vinna og taka saman skýrslur um fleiri en eina gerð prófunar (prófun 1, RDE-prófun, prófun 4, prófun 6) en í tölfræðiferlinu skal einungis taka tillit til fyrstu gildu prófunar af hverri gerð.

5.7.1. Almennar kröfur

Ökutækið skal tilheyra notkunarsamræmishópi eins og lýst er í 3. lið og skal standast eftirlitið sem sett er fram í töflunni í 1. viðbæti. Það skal vera skráð í Sambandinu og a.m.k. 90% af aksturstíma þess skulu hafa átt sér stað innan Sambandsins. Heimilt er að framkvæma losunarprófun á öðru landsvæði en því þar sem ökutækin eru valin.

Því ökutæki sem er valið skal fylgja viðhaldsskrá sem sýnir að ökutækinu hafi verið viðhaldið á tilhlýðilegan hátt og þjónustun þess hafi verið í samræmi við ráðleggingar framleiðanda og að einungis upprunalegir íhlutir hafi verið notaðir við endurnýjun á hlutum sem tengjast losun.

Ökutæki sem bera merki um misnotkun, óviðeigandi notkun sem getur haft áhrif á mengunarvarnagetu þess, óheimila breytingu eða skilyrði sem geta leitt til þess að notkun ökutækis sé óörugg skulu útilokuð frá prófun á notkunarsamræmi.

Engar loftaflfræðilegar breytingar sem ekki er hægt að fjarlægja fyrir prófun skulu hafa verið gerðar á ökutækjunum.

Ökutæki skal útilokað frá prófun á notkunarsamræmi ef upplýsingarnar, sem vistaðar eru í innbyggðu tölvunni, sýna að ökutækið hafi verið í notkun eftir að bilanakóði birtist og að viðgerð hafi ekki farið fram í samræmi við forskriftir framleiðanda.

Ökutæki skal útilokað frá prófun á notkunarsamræmi ef eldsneytið úr eldsneytisgeymi ökutækisins uppfyllir ekki viðeigandi staðla sem mælt er fyrir um í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB ([1]) eða ef vísbendingar eða skráningar eru til um að eldsneytisáfylling hafi farið fram með rangri eldsneytistegund.

5.7.2. Skoðun og viðhald ökutækis

Greiningar á bilunum og allt eðlilegt viðhald sem þykir nauðsynlegt í samræmi við 1. viðbæti skal fara fram á ökutækjum, sem samþykkt hafa verið til prófunar, annaðhvort áður en eða eftir að prófun á notkunarsamræmi fer fram.

Eftirfarandi athuganir skulu fara fram: Athuganir með innbyggðu greiningarkerfi (framkvæmt fyrir eða eftir prófunina), sjónrænar athuganir á hvort að kveikt sé á ljóskerum bilanavísa, athuganir á heilleika loftsíu, allra drifreima, vökvaborða, vatnskassaloks og loks á eldsneytisáfyllingarstút, allra sogslangna og slangna í eldsneytiskerfi og raflagna sem tengjast eftirmeðferðarkerfinu; athuganir á kveikju, eldsneytismælum og íhlutum mengunarvarnar-búnaðar með tilliti til vanstillinga og/eða þess hvort átt hafi verið við búnaðinn.

Ef minna en 800 km vantar upp á að ökutækið fari í reglubundna þjónustuskoðun skal framkvæma þá skoðun.

Fjarlægja skal rúðuvökvann og skipta honum út með heitu vatni fyrir prófun 4.

Taka skal eldsneytissýni og geyma það í samræmi við kröfurnar í III. viðauka A til frekari greiningar ef niðurstaða er ófullnægjandi.

Allar bilanir skulu skráðar. Ef bilunin er í mengunarvarnarbúnaðinum skal ökutækið teljast vera bilað og það skal ekki notað áfram til prófunar en taka skal tillit til bilunarinnar að því er varðar matið á uppfyllingu ákvæða sem gert er í samræmi við lið 6.1.

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/70/EB frá 13. október 1998 um gæði bensíns og dísileldsneytis og breytingu á tilskipun ráðsins 93/12/EBE (Stjtíð. EB L 350, 28.12.1998, bls. 58).

5.8. Úrtaksstærð

Þegar framleiðendur beita tölfræðiferlinu sem skilgreint er í lið 5.10 fyrir prófun 1 skal breyta fjölda úrtaka á grundvelli árlegrar heildarsölu innan Sambandsins á ökutækjahópi í notkun, eins og lýst er í eftirfarandi töflu:

Tafla B.1

Fjöldi úrtaka vegna prófunar á notkunarsamræmi með prófun 1

ESB-skráningar ökutækja á sýnatökutímabilinu á hverju almanaksári	Fjöldi úrtaka (fyrir prófun 1)
allt að 100 000	1
100 001 að 200 000	2
yfir 200 000	3

Hvert úrtak skal innihalda nógu margar gerðir ökutækja til þess að tryggja að það nái til a.m.k. 20% af heildarsölu í hópnum. Ef þörf er á fleiri en einu úrtaki úr hópi ökutækja skulu annað og þriðja úrtak endurspegla önnur notkunarskilyrði ökutækja en þau sem valin eru fyrir fyrsta úrtakið.

5.9. Notkun rafræns vettvangs fyrir samræmi ökutækja í notkun og aðgangur að gögnum sem þörf er á vegna prófunar

Framkvæmdastjórnin skal setja á stofn rafrænan vettvang til að greiða fyrir gagnaskiptum, annars vegar milli framleiðenda, faggiltra rannsóknarstofa eða tækniþjónusta og hins vegar gerðarviðurkenningarvaldsins sem veitir viðurkenninguna, og til að greiða fyrir því að fullnægjandi eða ófullnægjandi niðurstaða fáist úr úrtaki.

Framleiðandinn skal fullgera möppuna um gagnsæi prófana sem um getur í 12. mgr. 5. gr. með því sniði sem tilgreint er í töflum 1 og 2 í 5. viðbæti og í töflunni í þessum lið og senda möppuna til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins sem veitir gerðarviðurkenningu með tilliti til losunar. Nota skal töflu 2 í 5. viðbæti til að gera kleift að velja ökutæki úr sama hópnum til prófunar og ásamt töflu 1 skal hún notuð til að veita fullnægjandi upplýsingar um ökutæki sem prófa skal.

Þegar rafræni vettvangurinn sem um getur í fyrstu málsgrein verður tiltækur skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir gerðarviðurkenningu með tilliti til losunar hala upp upplýsingunum í töflum 1 og 2 í 5. viðbæti á þennan vettvang innan 5 virkra daga frá móttöku þeirra.

Allar upplýsingar í töflum 1 og 2 í 5. viðbæti skulu vera aðgengilegar almenningi á rafrænu formi án endurgjalds.

Eftirfarandi upplýsingar skulu einnig koma fram í möppunni um gagnsæi prófunar og framleiðandinn skal veita þær án endurgjalds innan 5 virkra daga frá því að faggilt rannsóknarstofa eða tækniþjónusta leggur fram beiðnina.

ID	Ílag	Lýsing
1.	Ef hún er til, sérstök aðferð við umbreytingu ökutækja (fjórhjóladrif yfir í tvíhjóladrif) til aflmælisprófunar	Eins og skilgreint er í lið 2.4.2.4 í 6. undirviðauka XXI. viðauka
2.	Leiðbeiningar um notkunarham aflmælis, ef þær liggja fyrir	Hvernig skal virkja notkunarham aflmælis eins og einnig er gert við gerðarviðurkenningarprófanir
3.	Fríhjólunarhamur notaður við gerðarviðurkenningar-prófanir	Leiðbeiningar um hvernig eigi að virkja fríhjólunar-ham ef ökutækið hefur slíkan ham
4.	Framkvæmd á afhleðslu rafhlöðu (tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu, hreint rafökutæki)	Aðferð framleiðanda upprunalegs búnaðar til að tæma rafgeymi til að undirbúa tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu undir hleðsluprófun og undirbúa hreint rafökutæki undir hleðslu rafgeymisins
5.	Aðferð til að slökkva á öllum aukabúnaði	Ef hún er notuð við gerðarviðurkenningarprófun

5.10. Tölfræðiferli

5.10.1. Almenn

Sannprófun á samræmi ökutækja í notkun skal byggjast á tölfræðiferli samkvæmt almennum meginreglum um raðbundna sýnatöku við skoðun út frá eiginleikum. Fyrir prófun 1 og RDE-prófun er lágmarksstærð úrtaks til að fá fullnægjandi niðurstöðu þrjú ökutæki og stærsta uppsafnaða úrtaksstærð er tíu ökutæki.

Nota má einfaldaða aðferð við prófanir 4 og 6 sem felur í sér að úrtakið skal samanstanda af þremur ökutækjum og skal teljast hafa ófullnægjandi niðurstöðu ef ekkert hinna þriggja ökutækja stenst prófunina og fullnægjandi niðurstöðu ef öll þrjú ökutækin standast prófunina. Ef tvö af þremur ökutækjum hafa fullnægjandi eða ófullnægjandi niðurstöðu getur gerðarviðurkenningaryfirvaldið ákveðið að gera frekari prófanir eða hafist handa við að meta hvort farið sé að tilskildum ákvæðum í samræmi við lið 6.1.

Ekki skal margfalda prófunarniðurstöður með spillistuðlum.

Hvað varðar ökutæki með uppgefin hámarksgildi fyrir losun í raunverulegum akstri sem skráð eru í lið 48.2 í samræmisvottorðinu eins og lýst er í IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB, sem eru lægri en losunarmörkin sem sett eru fram í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007, skal samræmið kannað bæði með tilliti til uppgefna hámarksgildisins fyrir losun í raunverulegum akstri sem er hækkað í samræmi við mörkin sem sett eru fram í lið 2.1.1 í III. viðauka A og með tilliti til losunar innan þeirra marka sem sett eru fram í lið 2.1 í þeim viðauka. Ef í ljós kemur að sýnið uppfyllir ekki uppgefin hámarksgildi fyrir losun í raunverulegum akstri sem aukin eru með viðeigandi vikmörkum mælióvissu, en að sýnið nær hins vegar að vera innan marka, skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna krefja framleiðandann um að hann grípi til ráðstafana til úrbóta.

Áður en fyrsta prófunin á samræmi ökutækja í notkun er framkvæmd skal framleiðandi, faggilt rannsóknarstofa eða tækniþjónusta (aðilinn) tilkynna gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna um þá ætlun sína að framkvæma prófun á samræmi ökutækja í tilteknum ökutækjahópi. Að viðtekinni þessari tilkynningu skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, útbúa nýja tölfræðimöppu til að vinna úr niðurstöðunum úr hverri viðeigandi samsetningu eftirfarandi mæliþátta fyrir þann tiltekna aðila eða þá samsetningu af aðilum: ökutækjahópur, gerð losunarprófunar og mengunarefni. Hefja skal aðskilin tölfræðiferli fyrir hverja viðeigandi samsetningu þeirra mæliþátta.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, skal einungis taka inn í hverja tölfræðimöppu þær niðurstöður sem viðeigandi aðili leggur fram. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, skal halda skrár um fjölda prófana sem gerðar eru, fjölda fullnægjandi og ófullnægjandi prófana og um önnur nauðsynleg gögn til að styðja tölfræðiferlið.

Þar eð fleiri en eitt tölfræðiferli getur verið opið á sama tíma fyrir tiltekna samsetningu af gerð prófunar og ökutækjahóps skal aðila einungis vera heimilt að leggja fram prófunarniðurstöður til eins tölfræðiferlis sem er opið fyrir tiltekna samsetningu af gerð prófunar og ökutækjahóps. Einungis skal tilkynna einu sinni um hverja prófun og allar prófanir (gildar, ekki gildar, ófullnægjandi eða fullnægjandi niðurstöður, o.s.frv.) skulu tilkynntar.

Halda skal áfram með hvert tölfræðiferli tengt samræmi ökutækja í notkun þar til útkoma fæst þar sem tölfræðiferlið skilar fullnægjandi eða ófullnægjandi niðurstöðu um sýnið í samræmi við lið 5.10.5. Ef niðurstaða næst ekki innan 12 mánaða frá því að tölfræðimappa er útbúin skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna þó ganga frá tölfræðimöppunni nema það ákveði að ljúka prófuninni vegna þeirrar tölfræðimöppu innan næstu 6 mánaða.

5.10.2. Sameining niðurstaðna úr prófun á samræmi ökutækja í notkun

Í almennu tölfræðiferli má sameina niðurstöður úr prófunum frá tveimur eða fleiri faggiltum rannsóknarstofum eða tækniþjónustum. Samsteypa niðurstaðna úr prófunum skal krefjast skriflegs samþykkis frá öllum hagsmunaraðilum sem leggja fram prófunarniðurstöður í samsteypta heild niðurstaðna og áður en prófun hefst skal senda tilkynningu um það til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins sem veitir viðurkenninguna. Einn þeirra aðila sem standa að samsteypu niðurstaðna úr prófunum skal skipaður leiðtogi aðilahópsins og skal sá bera ábyrgð á gagnaskýrslum og samskiptum við gerðarviðurkenningarvaldið sem veitir viðurkenninguna.

5.10.3. Fullnægjandi/ófullnægjandi/ógild niðurstaða úr einni prófun

Losunarprófun á samræmi ökutækja í notkun skal teljast hafa fullnægjandi niðurstöðu fyrir eitt eða fleiri mengunarefni þegar niðurstaða losunar er jafn mikil eða minni en losunarmörkin sem sett eru fram í I. viðauka reglugerðar (EB) nr. 715/2007 fyrir slíka gerð prófunar.

Losunarprófun skal teljast hafa ófullnægjandi niðurstöðu fyrir eitt eða fleiri mengunarefni þegar niðurstaða losunar er yfir samsvarandi losunarmörkum fyrir slíka gerð prófunar. Við hverja ófullnægjandi niðurstöðu úr prófun skal hækka fjölda ófullnægjandi niðurstaðna f (sjá lið 5.10.5) um 1 í því tölfræðilega tilviki.

Losunarprófun á samræmi ökutækja í notkun skal teljast ógild ef þær kröfur vegna prófunar sem um getur í lið 5.3 eru ekki uppfylltar. Ógildar niðurstöður úr prófun skulu útilokaðar frá tölfræðiferlinu.

Leggja skal niðurstöðurnar úr öllum prófunum á samræmi ökutækja í notkun fyrir gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna, innan tíu virkra daga frá framkvæmd hverrar prófunar. Við lok prófana skal ítarleg prófunarskýrsla látin fylgja niðurstöðum úr prófunum. Niðurstöðurnar skulu felldar inn í úrtakið í tímaröð eftir framkvæmd.

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal fella inn allar gildar niðurstöður úr losunarprófunum í viðeigandi opið tölfræðiferli þar til komist er að fullnægjandi eða ófullnægjandi niðurstöðu sýnis í samræmi við lið 5.10.5.

5.10.4. Meðhöndlun á einförum

Ef einfarar í niðurstöðum fyrirfinnast í tölfræðiferlinu fyrir sýnið getur slíkt leitt til ófullnægjandi niðurstöðu í samræmi við aðferðirnar sem lýst er hér að neðan:

Flokka skal einfara sem millistigs- eða mjög mikla einfara.

Niðurstaða úr losunarprófun skal teljast vera einfari á millistigi ef hún er 1,3 sinnum eða meira yfir gildandi losunarmörkum. Ef tveir slíkir einfarar fyrirfinnast í sýni skal það leiða til ófullnægjandi niðurstöðu fyrir sýnið.

Niðurstaða úr losunarprófun skal teljast vera mjög mikill einfari ef hún er 2,5 sinnum eða meira yfir gildandi losunarmörkum. Ef einn slíkur einfari fyrirfinnst í sýni skal það leiða til ófullnægjandi niðurstöðu fyrir sýnið. Í slíku tilviki skal framleiðandanum og gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna tilkynnt um númer skráningarmerkis ökutækisins. Eigendum ökutækis skal tilkynnt um þennan möguleika fyrir prófunina.

5.10.5. Fullnægjandi/ófullnægjandi niðurstaða sýnis

Að því er varðar ákvörðun um fullnægjandi/ófullnægjandi niðurstöðu sýnis táknar „p“ fjölda fullnægjandi niðurstaðna og „f“ táknar fjölda ófullnægjandi niðurstaðna. Hver fullnægjandi niðurstaða úr prófun skal auka p-gildið um 1 og hver ófullnægjandi niðurstaða úr prófun skal auka f-gildið um 1 í viðeigandi opnu tölfræðiferli.

Við innfellingu gildra niðurstaðna úr losunarprófunum í opið tilvik tölfræðiferlis skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið framkvæma eftirfarandi aðgerðir:

— Uppfæra uppsöfnuðu sýnastærðina „n“ fyrir það tilvik til að endurspegla heildarfjöldann af gildum losunarprófunum sem felldar eru inn í tölfræðiferlið,

— eftir mat á niðurstöðum, uppfæra fjölda fullnægjandi niðurstaðna p og fjölda ófullnægjandi niðurstaðna f,

— reikna út fjölda mjög mikilla einfara eða einfara á millistigi í sýninu í samræmi við lið 5.10.4.,

— athuga hvort að niðurstaða fáist með aðferðinni sem lýst er hér á eftir.

Niðurstaðan veltur á uppsöfnuðu sýnastærðinni n, fjölda fullnægjandi niðurstaðna p og ófullnægjandi niðurstaðna f ásamt fjölda einfara á millistigi og/eða mjög mikilla einfara í sýninu. Við ákvörðun um fullnægjandi/ófullnægjandi niðurstöðu fyrir sýni úr prófun á samræmi ökutækja í notkun skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna nota ákvörðunartöfluna á mynd B.2 fyrir ökutæki sem byggjast á gerðum sem eru viðurkenndar frá og með 1. janúar 2020 og nota ákvörðunartöfluna á mynd B.2.a fyrir ökutæki sem byggjast á gerðum sem eru viðurkenndar fram til 31. desember 2019. Töflurnar sýna hvaða ákvörðun skal taka í tengslum við tiltekna uppsafnaða sýnastærð n og fjölda ófullnægjandi niðurstaðna f.

Tveir valkostir eru mögulegir fyrir tölfræðiferli fyrir tiltekna samsetningu ökutækjahóps, gerðar losunarprófunar og mengunarefnis:

Niðurstaðan „sýni er fullnægjandi“ skal fást þegar viðeigandi ákvörðunartafla á mynd B.2 eða mynd B.2.a gefur fullnægjandi niðurstöðu varðandi núverandi uppsafnaða sýnastærð n og fjölda ófullnægjandi niðurstaðna f.

Taka skal ákvörðunina „sýni er ófullnægjandi“ ef a.m.k. eitt af eftirfarandi skilyrðum er uppfyllt varðandi tiltekna uppsafnaða sýnastærð n:

— Viðeigandi ákvörðunartaflan á mynd B.2 eða mynd B.2.a gefur ófullnægjandi niðurstöðu varðandi núverandi uppsafnaða sýnastærð n og fjölda ófullnægjandi niðurstaðna f.

— Til staðar eru tveir einfarar á millistigi,

— til staðar er einn mikill einfari.

Fáist engin niðurstaða skal tölfræðiferlinu haldið áfram og frekari niðurstöður skulu felldar inn í hana þar til niðurstaða fæst eða aðferðinni er lokið í samræmi við lið 5.10.1.

Mynd B.2

Ákvörðunartafla vegna tölfræðiferlisins fyrir ökutæki á grundvelli gerða sem eru viðurkenndar frá og með 1. janúar 2020 (þar sem „FULLN“ er fullnægjandi, „ÓFULLN“ er ófullnægjandi og „ÓÁKV“ er óákveðið)

Fjöldi ófullnægjandi niðurstaðna f								
10								ÓFULLN
9							ÓFULLN	ÓFULLN
8						ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
7					ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
6				ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
5			ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN
4		ÓFULLN	ÓFULLN	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN
3	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN	FULLN
2	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
1	ÓÁKV	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
0	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
	3	4	5	6	7	8	9	10

Uppsöfnuð sýnastærð n

Mynd B.2.a

Ákvörðunartafla vegna tölfræðiferlisins fyrir ökutæki sem eru gerðarviðurkennd til og með 31. desember 2019 (þar sem „FULLN“ er fullnægjandi, „ÓFULLN“ er ófullnægjandi og „ÓÁKV“ er óákveðið)

Fjöldi ófullnægjandi niðurstaðna f								
10								ÓFULLN
9							ÓFULLN	ÓFULLN
8						ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
7					ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
6				ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN	ÓFULLN
5			ÓFULLN	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN
4		ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN	FULLN
3	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN	FULLN	FULLN
2	ÓÁKV	ÓÁKV	ÓÁKV	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
1	ÓÁKV	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
0	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN	FULLN
	3	4	5	6	7	8	9	10

Uppsöfnuð sýnastærð n

5.10.6. Prófun á samræmi ökutækja í notkun fyrir fjölþrepa fullbúin ökutæki og ökutæki til sérstakra nota

Framleiðandi grunnökutækisins skal ákvarða leyfð gildi mæliþáttanna sem skráðir eru í töflu B.3. Skrá skal leyfð gildi mæliþáttanna fyrir hvern hóp í upplýsingaskjalið í gerðarviðurkenningunni með tilliti til losunar (sjá 3. viðbæti I. viðauka) og í gagnsæisskrá 1 í 5. viðbæti (raðir 45 til 48). Framleiðanda á seinna þrepi skal einungis vera heimilt að nota gildin fyrir losun grunnökutækisins ef fullbúið ökutækið helst innan leyfðra gilda mæliþátta. Skrá skal gildi mæliþátta hvers fjölþrepa fullbúins ökutækis í samræmisvottorð þess.

Tafla B.3

Gildi mæliþátta fyrir fjölþrepa ökutæki og ökutæki til sérstakra nota sem heimilt er að nota við gerðarviðurkenningu á losun grunnökutækisins

Gildi mæliþátta:	Leyfð gildi frá – til:
Massi fullbúins ökutækis tilbúins til aksturs (í kg)	
Framhlið fullbúins ökutækis (í cm^2)	
Snúningsmótstaða (kg/t)	
Áætluð framhlið loftstreymis inn um vatnskassarist (í cm^2)	

Ef fjölþrepa fullbúið ökutæki eða ökutæki til sérstakra nota er prófað og niðurstaða prófunarinnar er undir gildandi losunarmörkum skal ökutækið teljast hafa fullnægjandi niðurstöðu í notkunarsamræmishópnum að því er varðar lið 5.10.3.

Ef niðurstöður prófunarinnar á fullbúnu ökutæki eða ökutæki til sérstakra nota er yfir gildandi losunarmörkum en er ekki meira en 1,3 sinnum yfir gildandi losunarmörkum skal prófandinn athuga hvort ökutækið uppfyllir gildin í töflu B.3. Tilkynna skal gerðarviðurkenningaryfirvaldinu, sem veitir viðurkenninguna, um allt ósamræmi við þessi gildi. Ef ökutækið er ekki í samræmi við þau gildi skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, rannsaka ástæðurnar fyrir því og grípa til viðeigandi ráðstafana í tengslum við framleiðanda fjölþrepa fullbúins ökutækis eða ökutækis til sérstakra nota til að koma samræmi á að nýju, þ.m.t. með því að afturkalla gerðarviðurkenninguna. Ef ökutækið uppfyllir gildin í töflu B.3 skal það teljast vera ökutæki sem er merkt í notkunarsamræmishópnum að því er varðar lið 6.1.

Ef niðurstaðan úr prófuninni er meira en 1,3 sinnum yfir gildandi losunarmörkum skal líta á það sem ófullnægjandi niðurstöðu fyrir þann notkunarsamræmishóp að því er varðar lið 6.1, en ekki sem einfara í viðkomandi notkunarsamræmishópi. Ef fjölþrepa fullbúna ökutækið eða ökutækið til sérstakra nota er ekki í samræmi við gildin í töflu B.3 skal tilkynna það til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins, sem veitir viðurkenninguna, og það skal rannsaka ástæðurnar fyrir því og grípa til viðeigandi ráðstafana í tengslum við framleiðanda fjölþrepa fullbúna ökutækisins eða ökutækisins til sérstakra nota til að koma samræmi á að nýju, þ.m.t. með því að afturkalla gerðarviðurkenninguna.

6. Mat á uppfyllingu ákvæða

6.1. Innan 10 daga frá lokum prófunarinnar á samræmi ökutækja í notkun vegna sýnisins sem um getur í lið 5.10.5 skulu gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, og framleiðandinn hefja ítarlegar rannsóknir til að ákveða hvort notkunarsamræmishópurinn (eða hluti af honum) uppfyllir reglurnar um samræmi ökutækja í notkun og hvort þörf sé á ráðstöfunum til úrbóta. Varðandi fjölþrepa ökutæki eða ökutæki til sérstakra nota skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna einnig framkvæma ítarlegar rannsóknir ef a.m.k. þrjú biluð ökutæki hafa sömu bilun eða fimm ökutæki eru merkt í sama notkunarsamræmishópnum, eins og sett er fram í lið 5.10.6.

6.2. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, skal tryggja að nægilegt fjármagn sé tiltækt til að standa straum af kostnaðinum vegna matsins á uppfyllingu ákvæða. Með fyrirvara um landslög skal endurheimta þennan kostnað með gjöldum sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, getur lagt á framleiðandann. Slík gjöld skulu standa straum af öllum prófunum eða úttektum sem þörf er á til að unnt sé að meta uppfyllingu ákvæða.

6.3. Óski framleiðandinn þess getur gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, rýmkað rannsóknirnar til að ná yfir ökutæki sem eru í notkun hjá sama framleiðanda og sem tilheyra öðrum notkunarsamræmishópum sem líklegt er að hafi sömu ágalla.

6.4. Ítarlegu rannsókninni skal lokið innan 60 virkra daga frá því að gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, hefur rannsóknina. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, getur framkvæmt viðbótarprófanir á samræmi ökutækja í notkun til að komast að því hvers vegna ökutæki hafa ekki staðist upphaflegu prófanirnar. Framkvæma skal viðbótarprófanirnar við svipuð skilyrði og upphaflegu prófanirnar á samræmi ökutækja í notkun sem ökutækin stóðust ekki.

Framleiðandinn skal, að beiðni gerðarviðurkenningaryfirvaldsins, sem veitir viðurkenninguna, leggja fram viðbótarupplýsingar sem sýna einkum fram á mögulega ástæðu þess að ökutæki stóðust ekki prófanirnar, hvaða hlutar hópsins gætu orðið fyrir áhrifum af þessu, hvort að aðrir hópar gætu orðið fyrir áhrifum af þessu eða, ef við á, hvers vegna vandinn sem olli því að ökutæki stóðust ekki upphaflegu prófanirnar á samræmi ökutækja í notkun tengist ekki notkunarsamræmi. Veita skal framleiðandanum tækifæri til að færa sönnur á að farið hafi verið að ákvæðunum um samræmi ökutækja í notkun.

6.5. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal, innan frestsins sem settur er fram í lið 6.3, taka ákvörðun um uppfyllingu ákvæða og um þörfina að beita ráðstöfunum til úrbóta vegna notkunarsamræmishópsins sem fellur undir ítarlegu rannsóknirnar og skal yfirvaldið tilkynna framleiðandanum um þá ákvörðun.

7. Ráðstafanir til úrbóta

7.1. Framleiðandinn skal koma á áætlun um ráðstafanir til úrbóta og leggja hana fyrir gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, innan 45 virkra daga frá tilkynningunni sem um getur í lið 6.4. Rýmka má það tímabil um allt að 30 virka daga til viðbótar ef framleiðandinn sýnir gerðarviðurkenningaryfirvaldinu, sem veitir viðurkenninguna, fram á að meiri tíma þurfi til að rannsaka ástæðurnar fyrir ósamræminu.

7.2. Þær ráðstafanir til úrbóta sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, krefst skulu m.a. felast í prófunum á íhlutum og ökutækjum sem eru útfærðar með réttmætum hætti og eru nauðsynlegar til þess að sýna fram á skilvirkni og endingu ráðstafananna til úrbóta.

7.3. Framleiðandinn skal gefa áætluninni um ráðstafanir til úrbóta sérstakt einkennisnafn eða númer. Áætlunin um ráðstafanir til úrbóta skal a.m.k. felast í eftirfarandi:

a) Lýsingu á hverri losunargerð ökutækis sem áætlunin um ráðstafanir til úrbóta nær til,

b) lýsingu á þeim sérstöku lagfæringum, breytingum, viðgerðum, leiðréttingum, stillingum eða öðrum breytingum sem gera þarf til að ökutækið verði í samræmi, þar með talin samantekt á þeim gögnum og tæknilegu rannsóknum sem renna stoðum undir ákvarðanir framleiðandans er lúta að þeim tilteknu ráðstöfunum til úrbóta sem grípa á til,

c) lýsingu á með hvaða hætti framleiðandinn hyggst upplýsa eigendur ökutækjanna um áætluðu ráðstafanirnar til úrbóta,

d) lýsingu á réttu viðhaldi eða notkun, ef slíku er til að dreifa, sem framleiðandinn gerir að skilyrði fyrir rétti til lagfæringa samkvæmt áætluninni um ráðstafanir til úrbóta, ásamt útskýringu á því hvers vegna slík skilyrði eru nauðsynleg,

e) lýsingu á þeirri málsmeðferð sem eigendur ökutækja skulu fylgja til að fá leiðréttingu á ósamræminu; í lýsingunni skal koma fram eftir hvaða dag skal gera ráðstafanir til úrbóta, hver áætlaður viðgerðartími verkstæðisins er og hvar þær geta farið fram,

f) dæmi um þær upplýsingar sem komið hefur verið á framfæri við eigendur ökutækjanna,

g) stutta lýsingu á því kerfi sem framleiðandinn notar til að tryggja nægilegar birgðir íhluta eða kerfa til þess að aðgerðir um ráðstafanir til úrbóta nái fram að ganga, þ.m.t. upplýsingar um hvenær nægilegar birgðir íhluta, hugbúnaðar eða kerfa sem þörf er á til að hefja beitingu slíkra ráðstafana til úrbóta munu vera tiltækar,

h) dæmi um allar leiðbeiningar sem senda á þeim viðgerðarverkstæðum sem framkvæma munu viðgerðirnar,

i) lýsingu á þeim áhrifum sem fyrirhugaðar ráðstafanir til úrbóta munu hafa á losun mengunarefna, eldsneytisnotkun, akstursháefni og öryggi hverrar losunargerðar ökutækis, sem fellur undir áætlunina um ráðstafanir til úrbóta, þ.m.t. gögn og tæknilegar rannsóknir sem styðja þessar niðurstöður,

j) ef í áætluninni um ráðstafanir til úrbóta felst innköllun ökutækja skal láta gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna í té lýsingu á því með hvaða hætti viðgerðir eru skráðar. Ef merkimiði er notaður skal einnig leggja fram sýnishorn af honum.

Að því er varðar d-lið getur framleiðandinn ekki gert kröfu um viðhald eða notkunarskilyrði sem ekki hefur verið sýnt fram á að tengist ósamræminu og ráðstöfununum til úrbóta.

7.4. Viðgerðin skal fara fram á hagkvæman hátt og innan eðlilegra tímamarka eftir að framleiðandinn hefur fengið ökutækið til viðgerðar. Innan 15 virkra daga frá móttöku tillögu að áætlun um ráðstafanir til úrbóta skal gerðarviður-kenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna annaðhvort samþykkja hana eða krefjast nýrrar tillögu í samræmi við lið 7.5.

7.5. Ef gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, samþykkir ekki áætlunina um ráðstafanir til úrbóta skal framleiðandinn þróa nýja áætlun og leggja hana fyrir þetta yfirvald innan 20 virkra daga frá tilkynningu um ákvörðun þess.

7.6. Ef gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, samþykkir ekki seinni tillöguna sem framleiðandinn leggur fram skal yfirvaldið grípa til allra viðeigandi ráðstafana í samræmi við 30. gr. tilskipunar 2007/46/EB til að koma samræmi á að nýju, þ.m.t. með því að afturkalla gerðarviðurkenninguna ef nauðsyn krefur.

7.7. Gerðarviðurkenningaryfirvaldinu sem veitir viðurkenninguna ber að tilkynna öllum aðildarríkjunum og framkvæmdastjórninni um ákvörðun sína innan 5 virkra daga.

7.8. Ráðstafanirnar til úrbóta skulu gilda um öll ökutæki í notkunarsamræmishópnum (eða í öðrum viðeigandi hópum sem framleiðandinn tilgreinir í samræmi við lið 6.2) sem líkleg eru til að verða fyrir áhrifum af sama ágallanum. Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal ákveða hvort nauðsynlegt sé að breyta gerðarviður-kenningunni.

7.9. Framleiðandinn ber ábyrgð á framkvæmd samþykktu áætlunarinnar um ráðstafanir til úrbóta í öllum aðildarríkjum og ber að halda skrá yfir hvert ökutæki sem tekið er af markaði eða kallað inn og gert við og um það hvaða verkstæði framkvæmdi viðgerðina.

7.10. Framleiðandinn skal geyma afrit af samskiptum sínum við þá viðskiptavini sem eiga ökutæki sem verða fyrir áhrifum áætlunarinnar um ráðstafanir til úrbóta. Framleiðandinn skal einnig halda skrá um innköllunarátakið, þ.m.t. heildarfjölda ökutækja sem verða fyrir áhrifum í hverju aðildarríki og heildarfjölda ökutækja sem hafa þegar verið innkölluð í hverju aðildarríki, ásamt skýringu á öllum töfum á beitingu ráðstafananna til úrbóta. Annan hvern mánuð skal framleiðandinn senda skrána um innköllunarátakið til gerðarviðurkenningaryfirvaldsins sem veitir viðurkenninguna, gerðarviðurkenningaryfirvalda sérhvers aðildarríkis og framkvæmdastjórnarinnar.

7.11. Aðildarríki skulu grípa til ráðstafana til að tryggja að samþykktu áætluninni um ráðstafanir til úrbóta sé beitt innan tveggja ára gagnvart minnst 90% þeirra ökutækja sem verða fyrir áhrifum og sem skráð eru á þeirra yfirráðasvæði

7.12. Skrá ber viðgerð og breytingu eða ísetningu nýs búnaðar í vottorð sem eiganda ökutækisins er látið í té og skal það innihalda númer átaksins um ráðstafanir til úrbóta.

8. Árleg skýrsla gerðarviðurkenningaryfirvalds sem veitir viðurkenninguna

Gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna skal, eigi síðar en 31. mars á hverju ári, birta, á vefsetri sem er aðgengilegt almenningi, gjaldfrjálst og án þess að notandinn þurfi að segja á sér deili eða að skrá sig, skýrslu yfir niðurstöður úr öllum rannsóknum á samræmi ökutækja í notkun sem lokið var á undangengnu ári. Ef einhverjar rannsóknir á samræmi ökutækja í notkun frá fyrra ári eru enn yfirstandandi á þeim degi skal gefa skýrslu um þær um leið og rannsókninni lýkur. Í skýrslunni skulu koma fram a.m.k. þau atriði sem tilgreind eru í 4. viðbæti.

———

1. viðbætir

Viðmiðanir við val á ökutækjum og ákvörðun um ófullnægjandi niðurstöðu um ökutæki

Val á ökutækjum fyrir samræmisprófun losunar við notkun

			Trúnaðarmál
Dagsetning:			**x**
Nafn rannsakanda:			**x**
Prófunarstaður:			**x**
Skráningarland (einungis innan ESB):		**x**	

Einkenni ökutækisins	**x = útilokunar-viðmiðanir**	**X = athugað og tilkynnt**	
Númer skráningarmerkis:		**x**	**x**
Ekin vegalengd: *Ökutækinu þarf að hafa verið ekið á bilinu 15 000 (eða 30 000 km vegna prófunar á losun við uppgufun) til 100 000 km*	**x**		
Dagsetning fyrstu skráningar: *Ökutækið þarf að vera á bilinu 6 mánaða (eða tólf mánaða vegna prófunar á losun við uppgufun) til 5 ára gamalt*	**x**		

Verksmiðjunúmer ökutækis:		**x**	
Flokkur og eiginleiki losunar:		**x**	
Skráningarland: *Ökutækið þarf að vera skráð innan ESB*	**x**	**x**	
Gerð:		**x**	
Hreyfilkóði:		**x**	
Rúmtak hreyfils (l):		**x**	
Hreyfilafl (kW):		**x**	
Tegund gírkassa (sjálfskipting/handskipting):		**x**	
Drifás (framhjóladrif/aldrif/afturhjóladrif):		**x**	
Stærð hjólbarða (að framan og aftan ef munur er á stærðinni)		**x**	
Er ökutækið hluti af innköllunar- eða þjónustuátaki? **Ef svarið er já: Hvaða? Hefur viðgerðum tengdum átakinu þegar verið lokið?** *Viðgerðunum verður að hafa verið lokið*	**x**	**x**	

Viðtal við eiganda ökutækis

(eigandinn verður einungis spurður mikilvægustu spurninga og skal ekki vera meðvitaður um afleiðingar svaranna)

Nafn eiganda (einungis aðgengilegt faggiltum skoðunaraðila eða faggiltri rannsóknarstofu/tækniþjónustu)			x
Tengiliður (heimilisfang/símanúmer) (einungis aðgengilegt faggiltum skoðunaraðila eða faggiltri rannsóknarstofu/tækni-þjónustu)			x

Hversu margir hafa eigendur ökutækisins verið?		**x**	
Virkaði kílómetramælirinn ekki? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur ökutækið verið notað í einum tilgangi af eftirfarandi?			
Sem bifreið til notkunar í sýningarsal?		**x**	
Sem leigubifreið?		**x**	
Sem sendibifreið?		**x**	
Í kappakstri/akstursíþróttum?	**x**		
Sem bílaleigubifreið?		**x**	
Hefur ökutækið borið þungar byrðar umfram forskriftir framleiðanda? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hafa meiri háttar viðgerðir verið gerðar á hreyfli eða ökutæki?		**x**	
Hafa meiri háttar viðgerðir verið gerðar á hreyfli eða ökutæki án leyfis? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur vélarafl verið aukið/stillt? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur verið skipt um einhvern hluta eftirmeðferðarkerfisins fyrir útblástursloft og/eða eldsneytiskerfisins? Voru upprunalegir hlutir notaðir? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef upprunalegir hlutir voru ekki notaðir.*	**x**	**x**	
Hefur einhver hluti eftirmeðferðarkerfisins verið varanlega fjarlægður? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur einhver óleyfilegur búnaður verið settur upp (þvagefniseyðir, hermir, o.s.frv.)? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur ökutækið lent í alvarlegu slysi? Leggja skal fram skrá yfir skemmdir og viðgerðir sem gerðar hafa verið eftir það		**x**	

Hefur bifreiðin áður verið notuð með rangri eldsneytistegund (s.s. bensín í stað fyrir dísilolíu)? Hefur bifreiðin verið notuð með eldsneyti af ESB-gæðum sem er ekki fáanlegt á markaði (fengið á svörtum markaði eða er blandað eldsneyti?) *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur loftfrískari, mælaborðshreinsir, hemlahreinsir eða annars konar uppspretta mikillar vetniskolefnislosunar verið notuð kringum ökutækið á síðasta mánuði? *Ekki er hægt að velja ökutækið til prófunar á losun við uppgufun ef svarið er já.*	**x**		
Hefur bensínleki átt sér stað innan í eða utan á ökutækinu á síðustu 3 mánuðum? *Ekki er hægt að velja ökutækið til prófunar á losun við uppgufun ef svarið er já.*	**x**		
Hefur einhver reykt inn í bifreiðinni á síðustu 12 mánuðum? *Ekki er hægt að velja ökutækið til prófunar á losun við uppgufun ef svarið er já.*	**x**		
Hefur tæringarvörn, sjálflímandi miðar eða undirvagnsvörn verið sett á einhverjar aðrar mögulegar uppsprettur rokgjarnra efnasambanda á ökutækinu? *Ekki er hægt að velja ökutækið til prófunar á losun við uppgufun ef svarið er já.*	**x**		
Hefur ökutækið verið endurmálað? *Ekki er hægt að velja ökutækið til prófunar á losun við uppgufun ef svarið er já.*	**x**		
Hvar er ökutækið mest notað?			
% hraðbraut		**x**	
% dreifbýli		**x**	
% þéttbýli		**x**	
Hefur ökutækinu verið ekið í ríki utan ESB í meira en 10% af aksturstímanum? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	~~**x**~~	**—**	
Í hvaða landi var eldsneyti fyllt á ökutækið í síðustu tvö skiptin? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef eldsneyti var fyllt á ökutækið í síðustu tvö skiptin utan ríkis sem beitir ESB-eldsneytisstöðlum.*	**x**		
Hefur verið notað íblöndunarefni í eldsneyti sem framleiðandinn hefur ekki samþykkt? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**		
Hefur ökutækinu verið viðhaldið og það notað í samræmi við leiðbeiningar frá framleiðanda? *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er nei.*	**x**		
Heildaryfirlit yfir fyrri þjónustu og viðgerðir, þ.m.t. öll endursmíði *Ekki er hægt að velja ökutækið ef ekki er mögulegt að leggja fram öll gögnin.*	**x**		

	Skoðun og viðhald ökutækis	**X = Útilokunarviðmiðanir/ B = Bilað ökutæki**	**X = athugað og tilkynnt**
1	**Eldsneytismagn geymis (fullur/tómur)** Logar varaeldsneytisljósið? *Fyllið á eldsneyti fyrir prófun ef svarið er já.*		**x**
2	**Loga einhver viðvörunarljós í mælaborðinu sem gefa til kynna bilun í ökutæki eða eftirmeðferðarkerfi fyrir útblástursloft sem ekki er hægt að ráða bót á með venjulegu viðhaldi? (Bilanavísisljós, gaumljós fyrir hreyfil, o.s.frv.)** *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já.*	**x**	
3	**Logar ljósið fyrir valvísa afoxun með hvata (SCR) eftir að hreyfill er gangsettur?** *Ef svarið er já ætti að fylla á AdBlue dísilútblástursvökva eða framkvæma viðgerð áður en ökutækið er notað í prófun.*	**x**	
4	**Sjónræn skoðun á útblásturskerfi** Athuga leka milli útblástursgreinar og enda útblástursrörs. Athuga og skjalfesta (með ljósmyndum) *Ökutækið telst vera **bilað** ef skemmdir eða lekar finnast.*	**B**	
5	**Íhlutir sem tengjast útblásturslofti** Athuga skal og skjalfesta (með ljósmyndum), með tilliti til skemmda, alla íhluti sem tengjast útblæstri. *Ökutækið telst vera **bilað** ef skemmdir finnast.*	**B**	
6	Uppgufunarkerfi Settur er þrýstingur á eldsneytiskerfið (frá hylkinu) til að prófa hvort það leki í umhverfi þar sem umhverfishiti er stöðugur og prófun er gerð með logajónunarnema kringum ökutækið og um borð í ökutækinu. *Ökutækið telst verða **bilað** ef niðurstaða prófunarinnar með logajónunarnema er ófullnægjandi.*	**B**	
7	**Eldsneytissýni** Taka eldsneytissýni úr eldsneytisgeyminum.		**x**
8	**Loftsía og olíusía** Athuga síur með tilliti til mengunar og skemmda og skipta um þær sem eru skemmdar eða mikið mengaðar eða ef minna en 800 km eru eftir þar til næsta skipting er ráðlögð.		**x**
9	**Rúðuvökvi (einungis vegna prófunar á losun við uppgufun)** Fjarlægja rúðuvökva og fylla geyminn með heitu vatni.		**x**
10	**Hjól (að framan & aftan)** Athuga hvort að hjólin snúast án hindrunar eða hvort hemillinn hindrar snúning. *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er nei.*	**x**	

11	**Hjólbarðar (einungis vegna prófunar á losun við uppgufun)** Fjarlægja varahjólbarðann og skipta í jafnaða hjólbarða ef minna en 15 000 km eru frá því að síðast var skipt um hjólbarða. Einungis skal nota sumarhjólbarða og heilsárs-hjólbarða.		**x**
12	**Drifreim og hlíf yfir kæli** *Ökutækið telst vera bilað ef skemmdir finnast. Skjalfesta skal með ljósmyndum.*	**F**	
13	**Athuga vökvaborð** Athuga skal hámark og lágmark vökvaborðs (smurolía, kælivökvi)/fylla á ef undir lágmarki		**x**
14	**Áfyllingarloki (einungis vegna prófunar á losun við uppgufun)** Athuga að yfirfallsleiðslan innan við eldsneytishlerann sé alveg laus við efnaleifar eða skola eldsneytisslönguna með heitu vatni.		**x**
15	**Sogslöngur og raflagnir** Athuga skal að allar séu í lagi. *Ökutækið telst vera bilað ef skemmdir finnast. Skjalfesta skal með ljósmyndum.*	**B**	
16	**Innsprautunarloki/kaplar** Athuga alla kapla og eldsneytisleiðslur. *Ökutækið telst vera bilað ef skemmdir finnast. Skjalfesta skal með ljósmyndum.*	**B**	
17	**Kveikjuþráður (bensín)** Athuga skal kerti, kapla, o.s.frv. Skipta skal því út sem orðið hefur fyrir skemmdum.		**x**
18	**Útblásturshringrás og hvati, agnasía** Athuga skal alla kapla, víra og nema. *Ekki er hægt að velja ökutækið ef átt hefur verið við það. Ökutækið telst vera bilað ef skemmdir finnast. Skjalfesta skal með ljósmyndum.*	**x/F**	
19	**Öryggisskilyrði** Athuga hvort að hjólbarðar, yfirbygging ökutækis, rafkerfi og hemlakerfi séu í öruggu ástandi fyrir prófunina og í samræmi við umferðarreglur. *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er nei.*	**x**	
20	**Festivagn** Eru rafmagnskaplar fyrir tengingu við festivagna til staðar þar sem þeirra er krafist?		**x**
21	**Loftaflfræðilegar breytingar** Sannprófa að engar loftaflfræðilegar breytingar hafi verið gerðar á eftirmarkaði sem ekki er hægt að fjarlægja áður en prófun er gerð (hólf á þaki, farangursgrindur, lyftispillar, o.s.frv.) og að ekki vanti neina venjulega loftaflfræðilega íhluti (vindhlíf að framan, vinddreifi, vindkljúf, o.s.frv.). *Ekki er hægt að velja ökutækið ef svarið er já. Skjalfesta með ljósmyndum.*	**x**	

22	**Athuga hvort innan við 800 km vantar upp á að ökutækið fari í reglubundna þjónustuskoðun og framkvæma þá skoðun ef svo er.**		**x**
23	**Allar skoðanir þar sem krafist er að tengingar við innbyggt greiningarkerfi skuli gerðar á undan og/eða eftir prófun**		
24	**Hlutanúmer og prófsumma fyrir kvörðun á stýrieiningu aflrásar**		**x**
25	**Greining með innbyggðu greiningarkerfi (á undan eða eftir losunarprófun)** Lesa skal bilanagreiningarkóða og prenta villuskrá.		**x**
26	**Leit í þjónustuham innbyggðs greiningarkerfis 09 (á undan eða eftir losunarprófun)** Lesa þjónustuham 09. Skrá upplýsingarnar.		**x**
27	**Þjónustuhamur innbyggðs greiningarkerfis 7 (á undan eða eftir losunarprófun)** Lesa þjónustuham 07. Skrá upplýsingarnar.		

Athugasemdir varðandi: Viðgerð/útskipti á íhlutum/hlutanúmer

2. viðbætir

Reglur um framkvæmd prófunar 4 við athugun á samræmi ökutækja í notkun

Prófun 4 á samræmi ökutækja í notkun skal framkvæmd í samræmi við VI. viðauka (eða VI. viðauka við reglugerð (EB) nr. 692/2008, eftir atvikum) með eftirfarandi undantekningum:

— Ökutæki sem prófuð eru með prófun 4 skulu vera minnst 12 mánaða gömul.

— Hylkið skal teljast hafa verið látið eldast og þess vegna skal ekki fylgja aðferðinni við öldrun hylkis í prófunarbekk.

— Hlaða skal hylkið utan ökutækisins samkvæmt aðferðinni sem lýst er í þessum tilgangi í VI. viðauka og þá skal hylkið fjarlægt og sett á ökutækið samkvæmt leiðbeiningum framleiðandans um viðgerðir. Prófun með logajónunarnema (með niðurstöður undir 100 milljónarhlutum við 20 °C) skal gerð eins nálægt hylkinu og hægt er, á undan og eftir hleðslu, til að staðfesta að hylkið hafi verið fest með réttum hætti.

— Eldsneytisgeymirinn skal teljast hafa verið látinn eldast og þess vegna skal ekki bæta neinum gegndræpistuðli við í útreikninginn á niðurstöðu prófunar 4.

———

3. viðbætir

Ítarleg skýrsla um samræmi ökutækja í notkun

Eftirfarandi upplýsingar skulu koma fram í ítarlegu skýrslunni um samræmi ökutækja í notkun:

1. Nafn og heimilisfang framleiðanda,
2. nafn, póstfang, símanúmer, bréfasímanúmer og tölvupóstfang hlutaðeigandi prófunarstofu,
3. tegundarheiti ökutækja sem prófunaráætlunin nær yfir,
4. ef við á, skrá yfir gerðir ökutækja sem upplýsingar framleiðanda ná yfir, þ.e. vegna losunar gegnum útblástursrör, hóp ökutækja í notkun,
5. númer gerðarviðurkenninga sem gilda um þessar gerðir ökutækja innan hópsins, þ.m.t., ef við á, númer allra rýmkana og leiðréttinga og/eða afturkallana (endursmíði),
6. upplýsingar um rýmkanir og leiðréttingar og/eða afturkallanir á gerðarviðurkenningum ökutækja sem upplýsingar framleiðanda ná yfir (ef viðurkenningaryfirvaldið óskar eftir því),
7. tímabilið þegar upplýsinga var aflað,
8. framleiðslutími ökutækisins sem skýrslan nær yfir (t.d. ökutæki sem eru framleidd á almanaksárinu 2017),
9. aðferðin við athugun á samræmi ökutækja í notkun, þ.m.t.:
   i) aðferð við öflun ökutækja,
   ii) viðmiðanir fyrir val og höfnun ökutækja (þ.m.t. svörin sem skráð eru í töflunni í 1. viðbæti, þ.m.t. ljósmyndir),
   iii) gerðir og aðferðir prófana, sem notaðar eru í áætluninni,
   iv) viðmiðanir fyrir samþykki eða höfnun á hópi ökutækja,
   v) landsvæði þar sem framleiðandi hefur safnað upplýsingum,
   vi) stærð úrtaks og áætlun um val úrtaks,
10. niðurstöður úr aðferðinni við athugun á samræmi ökutækja í notkun, þ.m.t.:
    i) upplýsingar um ökutæki sem áætlunin nær yfir (hvort sem þau eru prófuð eða ekki). Upplýsingarnar skulu innihalda töfluna í 1. viðbæti.
    ii) prófunargögn um losun gegnum útblástursrör:
        — forskriftir fyrir prófunareldsneyti (þ.e. viðmiðunareldsneyti eða markaðseldsneyti),
        — prófunarskilyrði (hitastig, raki, tregðumassi aflmælis),
        — stilling aflmælis (þ.e. ökumótstaða, aflstilling),
        — niðurstöður úr prófun og útreikningur á fullnægjandi/ófullnægjandi niðurstöðu,
    iii) prófunargögn um losun við uppgufun:
        — forskriftir fyrir prófunareldsneyti (þ.e. viðmiðunareldsneyti eða markaðseldsneyti),
        — prófunarskilyrði (hitastig, raki, tregðumassi aflmælis),
        — stilling aflmælis (þ.e. ökumótstaða, aflstilling),
        — niðurstöður úr prófun og útreikningur á fullnægjandi/ófullnægjandi niðurstöðu.

———

4. viðbætir

Snið á árlegri skýrslu gerðarviðurkenningaryfirvaldsins, sem veitir viðurkenninguna, um samræmi ökutækja í notkun

FYRIRSÖGN

A. Stutt yfirlit og helstu niðurstöður

B. Starfsemi tengd samræmi ökutækja í notkun sem framleiðandi hefur sinnt á næstliðnu ári:

1) Upplýsingaöflun framleiðanda

2) Prófanir á samræmi ökutækja í notkun (þ.m.t. áætlanagerð og val á hópum sem prófaðir eru og lokaniðurstöður úr prófunum)

C. Starfsemi tengd samræmi ökutækja í notkun sem faggiltar rannsóknarstofur eða tækniþjónustur hafa sinnt á næstliðnu ári:

3) Öflun upplýsinga og áhættumat

4) Prófanir á samræmi ökutækja í notkun (þ.m.t. áætlanagerð og val á hópum sem prófaðir eru og lokaniðurstöður úr prófunum)

D. Starfsemi tengd samræmi ökutækja í notkun sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið sem veitir viðurkenninguna hefur sinnt á undangengnu ári:

5) Öflun upplýsinga og áhættumat

6) Prófanir á samræmi ökutækja í notkun (þ.m.t. áætlanagerð og val á hópum sem prófaðir eru og lokaniðurstöður úr prófunum)

7) Ítarlegar rannsóknir

8) Ráðstafanir til úrbóta

E. Mat á árlegri minnkun losunar sem búist er við vegna einhverra af ráðstöfunum til úrbóta varðandi samræmi ökutækja í notkun

F. Lærdómur (þ.m.t. af afköstum þeirra mælitækja sem voru notuð)

G. Skýrsla um aðrar ógildar prófanir

———

5. viðbætir

Gagnsæi

Tafla 1

Gagnsæisskrá 1

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
1	TA-auðkennisnúmer í 2017/1151	Texti	—	Eins og skilgreint er í I. viðauka/4. viðbæti
2	Auðkenni brúunarhóps	Texti	—	Eins og skilgreint er í lið 5.6 í almennum kröfum í XXI. viðauka.
3	Auðkenni PEMS-prófunarhóps	Texti	—	Eins og skilgreint er í lið 5.2 í 7. viðbæti við III. viðauka A.
4	Auðkenni Ki-hóps	Texti	—	Eins og skilgreint er í lið 5.9 í XXI. viðauka.
5	Auðkenni ATCT-hóps	Texti	—	Eins og skilgreint er í 6. undirviðauka a við XXI. viðauka.
6	Auðkenni hóps varðandi losun við uppgufun	Texti	—	Eins og skilgreint er í VI. viðauka

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
7	Ökumótstöðuhópsauðkenni ökutækis H	Texti	—	Eins og skilgreint er í lið 5.7 í XXI. viðauka
7a	Ökumótstöðuhópsauðkenni ökutækis L (ef við á)	Texti	—	Eins og skilgreint er í lið 5.7 í XXI. viðauka
8	Prófunarmassi ökutækis H	Tala	kg	WLTP-prófunarmassi eins og hann er skilgreindur í lið 3.2.25 í XXI. viðauka
8a	Prófunarmassi ökutækis L (ef við á)	Tala	kg	WLTP-prófunarmassi eins og hann er skilgreindur í lið 3.2.25 í XXI. viðauka
9	F0 fyrir ökutæki H	Tala	N	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
9a	F0 fyrir ökutæki L (ef við á)	Tala	N	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
10	F1 fyrir ökutæki H	Tala	N/km/klst.	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
10a	F1 fyrir ökutæki L (ef við á)	Tala	N/km/klst.	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
11	F2 fyrir ökutæki H	Tala	N/(km/klst.)^2	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
11a	F2 fyrir ökutæki L (ef við á)	Tala	N/(km/klst.)^2	Ökumótstöðustuðull eins hann er skilgreindur í 4. undirviðauka XXI. viðauka
12a	Massi koltvísýringslosunar frá ökutækjum H með brunahreyfil og tvinnrafökutækjum H sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu	Tölur	g/km	WLTP-koltvísýringslosun (lág, meðal, há, mjög há, samanlögð) eins og reiknað er út frá: — fyrir ökutæki með brunahreyfil, 9. þrep í töflu A7/1 í 7. undirviðauka við XXI. viðauka eða — fyrir tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, 8. þrep í töflu A8/5 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka
12aa	Massi koltvísýringslosunar frá ökutækjum L með brunahreyfil og tvinnrafökutækjum L sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu (ef við á)	Tölur	g/km	WLTP-koltvísýringslosun (lág, meðal, há, mjög há, samanlögð) eins og reiknað er út frá: — fyrir ökutæki með brunahreyfil, 9. þrep í töflu A7/1 í 7. undirviðauka við XXI. viðauka eða — fyrir tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, 8. þrep í töflu A8/5 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka
12b	Massi koltvísýringslosunar frá ökutækjum H sem ætluð eru fyrir ytri hleðslu	Tölur	g/km	WLTP-koltvísýringslosun í hleðsluham (lág, meðal, há, mjög há, samanlögð) eins og reiknað er út frá 8. þrepi í töflu A8/5 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka,

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
				WLTP-koltvísýringslosun í afhleðsluham (samanlögð) og WLTP-koltvísýringslosun (vegin, samanlögð) eins og reiknað er út frá 10. þrepi í töflu A8/8 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka.
12ba	Massi koltvísýringslosunar frá tvinnrafökutækjum L sem ætluð eru fyrir ytri hleðslu (ef við á)	Tölur	g/km	WLTP-koltvísýringslosun í hleðsluham (lág, meðal, há, mjög há, samanlögð) eins og reiknað er út frá 8. þrepi í töflu A8/5 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka, WLTP-koltvísýringslosun í afhleðsluham (samanlögð) og WLTP-koltvísýringslosun (vegin, samanlögð) eins og reiknað er út frá 10. þrepi í töflu A8/8 í 8. undirviðauka við XXI. viðauka.
13	Drifhjól ökutækis í ökutækjahópi	Texti	fram-hjóladrif, aftur-hjóladrif, fjórhjóladrif	Viðbót 1.7 við 4. viðbæti við I. viðauka,
14	Stilling vegkeflis við gerðarviðurkenningarprófun	Texti	einása eða tvíása	Eins og skilgreint er í liðum 2.4.2.4 og 2.4.2.5 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka.
15	Tilkynntur Vmax ökutækis H	Tala	km/klst.	Hámarkshraði ökutækis eins og skilgreint er í lið 3.7.2 í XXI. viðauka
15a	Tilkynntur Vmax ökutækis L (ef við á)	Tala	km/klst.	Hámarkshraði ökutækis eins og skilgreint er í lið 3.7.2 í XXI. viðauka
16	Hámarksnettóafl við snúningshraða hreyfils	Tala	... kW/... min	Eins og skilgreint er í 2. undirviðauka XXI. viðauka
17	Massi ökutækis H sem er tilbúið til aksturs	Tala	kg	Massi ökutækis sem er tilbúið til aksturs (MRO) eins og skilgreint er í lið 3.2.5 í XXI. viðauka
17a	Massi ökutækis L sem er tilbúið til aksturs (ef við á)	Tala	kg	Massi ökutækis sem er tilbúið til aksturs (MRO) eins og skilgreint er í lið 3.2.5 í XXI. viðauka
18	Valkvæður notkunarhamur eða valkvæðir notkunarhamir sem notaðir eru við gerðarviðurkenn-ingarprófanirnar (hrein brunahreyfilsökutæki) eða við hleðsluprófun (tvinnrafökutæki sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu, tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu, tvinnökutæki með efnarafala sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu)	Mismunandi möguleg snið (texti, myndir, o.s.frv.)	—	Ef fyrir hendi eru hamir sem ökumaður velur sem eru ekki aðalhamir skal í textanum lýsa öllum þeim hömum sem notaðir eru við prófanirnar
19	Valkvæður notkunarhamur eða valkvæðir notkunarhamir sem notaðir eru við gerðarviðurkenn-ingarprófanirnar í tengslum við afhleðsluprófun (tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu)	Mismunandi möguleg snið (texti, myndir, o.s.frv.)	—	Ef fyrir hendi eru hamir sem ökumaður velur sem eru ekki aðalhamir skal í textanum lýsa öllum þeim hömum sem notaðir eru við prófanirnar

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
20	Snúningshraði hreyfils í lausagangi	Tala	snún./mín.	Eins og skilgreint er í 2. undirviðauka XXI. viðauka
21	Gírafjöldi	Tala	—	Eins og skilgreint er í 2. undirviðauka XXI. viðauka
22	Gírhlutföll	Gildi í töflu	—	Gírhlutfall, endanlegt drifhlutfall eða –föll, heildargírhlutföll
23	Hjólbarðastærð prófunarökutækisins að framan og aftan	Bókstafir/Tölur	—	Notað við gerðarviðurkenningu
24	Aflferill við fullt álag í tengslum við ökutæki með brunahreyfil	Gildi í töflu	snún./mín. á móti Kw	Aflferillinn við fullt álag á snúningshraðasviði hreyfils frá n_{idle} til n_{rated} eða n_{max}, eða $n_{dv}(n_{gvmax}) \times v_{max}$, eftir því hvort er hærra.
25	Viðbótaröryggisbil	Vigur	%	Eins og skilgreint er í 2. undirviðauka XXI. viðauka
26	Sértækt n_min_drive	Tala Tafla (úr kyrrstöðu í fyrsta gír, úr öðrum til þriðja gírs,...)	snún./mín.	Eins og skilgreint er í 2. undirviðauka XXI. viðauka
27	Prófsumma ökutækja L og H í lotu	Tala	—	Mismunandi fyrir ökutæki L og H. Til að sannprófa réttleika lotunnar sem er notuð. Einungis tekið með ef lota er önnur en 3b
28	Gírskipting meðalgírs ökutækis H	Tala	—	Til að fullgilda mismunandi útreikninga á gírskiptingu
29	Leiðréttingarstuðull ATCT-hóps	Tala	—	Eins og skilgreint er í lið 3.8.1 í undirviðauka 6a við XXI. viðauka Eitt gildi fyrir hvert eldsneyti í ef um er að ræða ökutæki með margs konar eldsneyti.
30a	Samleggjandi Ki-stuðull eða stuðlar	Gildi í töflu	—	Tafla þar sem gildið er skilgreint fyrir hvert mengunarefni og fyrir koltvísýring (g/km, mg/km, …). Autt ef margfaldandi Ki-stuðlar eru gefnir upp.
30b	Margfaldandi Ki-stuðull eða -stuðlar	Gildi í töflu	—	Tafla þar sem gildi er skilgreint fyrir hvert mengunarefni og fyrir koltvísýringsgildið. Autt ef samleggjandi Ki-stuðlar eru gefnir upp.
31a	Samleggjandi spillistuðlar (DF)	Gildi í töflu	—	Tafla þar sem gildi er skilgreint fyrir hvert mengunarefni(g/km, mg/km, …). Autt ef margfaldandi DF-stuðlar eru gefnir upp.
31b	Margfaldandi spillistuðlar (DF)	Gildi í töflu	—	Tafla þar sem gildi er skilgreint fyrir hvert mengunarefni. Autt ef samleggjandi DF-stuðlar eru gefnir upp.
32	Spenna rafgeymis fyrir öll endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi	Tölur	V	Eins og skilgreint er í 2. viðbæti við 6. undirviðauka við XXI. viðauka vegna leiðréttingar á hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis (RCB) í tilviki ökutækja með brunahreyfil og í 2. viðbæti við 8. undirviðauka við XXI. viðauka vegna tvinnrafökutækja, rafökutækja og tvinnökutækja með efnarafala (DIN EN 60050-482)

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
33	K-leiðréttingarstuðull	Tala	(g/km)/(Wh/km)	Fyrir tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu, leiðréttingar á koltvísýringslosun í hleðsluham eins og skilgreint er í 8. undirviðauka við XXI. viðauka, fasatengt eða samanlagt
34a	Raforkunotkun ökutækis H	Tala	Wh/km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta $EC_{AC,weighted}$ (samanlagt) og fyrir hrein rafökutæki er þetta raforkunotkun (samanlögð) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka í XXI. viðauka
34b	Raforkunotkun ökutækis L (ef við á)	Tala	Wh/km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta $EC_{AC,weighted}$ (samanlagt) og fyrir hrein rafökutæki er þetta raforkunotkun (samanlögð) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka XXI. viðauka
35a	Rafdrægni ökutækis H	Tala	km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta full rafdrægni (EAER) við blandaðan akstur (samanlagt) og fyrir hrein rafökutæki er þetta hrein rafdrægni (samanlögð) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka XXI. viðauka
35b	Rafdrægni ökutækis L (ef við á)	Tala	km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta full rafdrægni (EAER) við blandaðan akstur (samanlagt) og fyrir hrein rafökutæki er þetta hrein rafdrægni (samanlögð) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka XXI. viðauka
36a	Rafdrægni ökutækis H í þéttbýli	Tala	km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta $EAER_{city}$ og fyrir hrein rafökutæki er þetta hrein rafdrægni (í borg) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka XXI. viðauka
36b	Rafdrægni ökutækis L í þéttbýli (ef við á)	Tala	km	Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta $EAER_{city}$ og fyrir hrein rafökutæki er þetta hrein rafdrægni (í borg) eins og skilgreint er í 8. undirviðauka XXI. viðauka
37a	Akturslotuflokkur ökutækis H	Texti	—	Til að vita hvaða lota (flokkur 1/2/3a/3b) hefur verið notuð til að reikna út orkuþörf í lotu hjá einstöku ökutæki
37b	Akturslotuflokkur ökutækis L (ef við á)	Texti	—	Til að vita hvaða lota (flokkur 1/2/3a/3b) hefur verið notuð til að reikna út orkuþörf í lotu hjá einstöku ökutæki
38a	Niðurskölun f_dsc ökutækis H	Tala	—	Til að vita hvort þörf er á niðurskölun og hvort hún hefur verið notuð til að reikna út orkuþörf í lotu hjá einstöku ökutæki
38b	Niðurskölun f_dsc ökutækis L (ef við á)	Tala	—	Til að vita hvort þörf er á niðurskölun og hvort hún hefur verið notuð til að reikna út orkuþörf í lotu hjá einstöku ökutæki
39a	Takmörkun á Hraða ökutækis H	já/nei	km/klst.	Til að vita hvort þörf er á aðferð með takmörkuðum hraða og hvort nota þurfi aðferðina til að reikna út orkuþörf í lotu fyrir einstakt ökutæki
39b	Takmarkaður hraði ökutækis L (ef við á)	já/nei	km/klst.	Til að vita hvort þörf er á aðferð með takmörkuðum hraða og hvort nota þurfi aðferðina til að reikna út orkuþörf í lotu fyrir einstakt ökutæki
40a	Tæknilega leyfilegur hámarksmassi ökutækis H með hleðslu	Tala	kg	

ID	Ílag	Tegund gagna	Eining	Lýsing
40b	Tæknilega leyfilegur hámarksmassi ökutækis L með hleðslu (ef við á)	Tala	kg	
41	Bein innsprautun	já/nei	—	
42	Greining á endurnýjun	Texti	—	Lýsing framleiðanda ökutækis á hvernig skal greina að endurnýjun hafi átt sér stað við prófun
43	Ljúka endurnýjun	Texti	—	Lýsing á aðferðinni til að ljúka endurnýjuninni
44	Þyngdardreifing	Vigur	—	Hundraðshluti af þyngd ökutækisins á hverjum ás
	Fyrir fjölþrepa ökutæki eða ökutæki til sérstakra nota			
45	Leyfilegur, endanlegur massi fullbúins ökutækis tilbúins til aksturs		kg	Frá–til
46	Leyfileg framhlið fullbúins ökutækis		cm^2	Frá–til
47	Leyfileg snúningsmótstaða		kg/t	Frá–til
48	Leyfileg áætluð framhlið fyrir loftstreymi inn um vatnskassaristina		cm^2	Frá–til

Tafla 2

Gagnsæisskrá 2

Gagnsæisskrá 2 samanstendur af tveimur gagnamengjum sem innihalda reitina í töflu 3 og töflu 4.

Tafla 3

Gagnamengi 1 í gagnsæisskrá 2

Reitur	Tegund gagna	Lýsing
ID1	Tala	Einkvæmt auðkenni línu í gagnamengi 1 í gagnsæisskrá 2
TVV	Texti	Einkvæmt auðkenni gerðar, afbrigðis, útfærslu ökutækisins (lykilreitur í gagnamengi 1)
IF ID	Texti	Auðkenni brúunarhópsins
RL ID	Texti	Auðkenni ökumótstöðuhópsins
Tegund	Texti	Viðskiptaheiti framleiðanda
Verslunarheiti	Texti	Verslunarheiti gerðar, afbrigðis, útfærslu (TVV)
Flokkur	Texti	Ökutækjaflokkur
Yfirbygging	Texti	Gerð yfirbyggingar

Tafla 4

Gagnamengi 2 í gagnsæisskrá 2

Reitur	Tegund gagna	Lýsing
ID2	Tala	Einkvæmt auðkenni línu í gagnamengi 2 í gagnsæisskrá 2
IF ID	Texti	Einkvæmt auðkenni brúunarhópsins (lykilreitur í gagnamengi 2)
WVTA-númer	Texti	Auðkenni gerðarviðurkenningar fullbúins ökutækis
TA-auðkennisnúmer tengt losun	Texti	Auðkenni gerðarviðurkenningar með tilliti til losunar
PEMS ID	Texti	Auðkenni PEMS-prófunarhópsins
EF ID	Texti	Auðkenni hóps varðandi losun við uppgufun
ATCT-auðkenni	Texti	Auðkenni ATCT-hópsins
Ki-auðkenni	Texti	Auðkenni Ki-hópsins
Auðkenni endingar	Texti	Auðkenni endingarhópsins
Eldsneyti	Texti	Eldsneytistegundir ökutækis
Tvíbrennieldsneyti	Já/Nei	Ef ökutækið getur notað fleiri en eina gerð eldsneytis
Slagrými hreyfils	Tala	Slagrými hreyfils í cm^3
Málafl hreyfils	Tala	Málafl hreyfilsins (kW við $mín^{-1}$)
Gerð gírkassa	Texti	Gerð aflyfirfærslu ökutækis
Aflásar	Texti	Fjöldi og staðsetning aflása
Rafvél	Texti	Númer og gerð rafvélar eða rafvéla
Hámarksnettóafl	Tala	Hámarksnettóafl rafvélarinnar
HEV-flokkur	Texti	Flokkur tvinnrafökutækis.“

III. VIÐAUKI

Ákvæðum III. viðauka A við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Í stað liðar 1.2.16 kemur eftirfarandi:

„1.2.16. „Mælisuð“: tvisvar sinnum kvaðratmeðaltalsrót af tíu staðalfrávikum sem hvert fyrir sig er reiknað frá núllsvörunum sem eru mældar í 30 sekúndur við stöðuga mælitíðni sem er margfeldi af 1,0 Hz.“

2) Í stað jöfnunnar í lið 2.1 kemur eftirfarandi:

„$NTE_{pollutant} = CF_{pollutant} \times$ EURO-6.“

3) Í stað orðanna „1 + vikmörk með vikmörk = 0,5“ í öðrum dálki töflunnar í lið 2.1.1 kemur „1 + *vikmörk* köfnunarefnisoxíðs með *vikmörk* köfnunarefnisoxíðs = 0,43.“

4) Eftirfarandi málsliður bætist við í lið 2.1.2:

„Við gerðarviðurkenningar samkvæmt þessari undanþágu skal ekki gefa upp neitt RDE-hámarksgildi.“

5) Í stað liðar 2.1.3 kemur eftirfarandi:

„2.1.3. Framleiðandi skal staðfesta að farið sé að ákvæðum liðar 2.1 með því að fylla út vottorðið sem er sett fram í 9. viðbæti. Sannprófun á að tilskilin ákvæði séu uppfyllt skal gerð í samræmi við reglurnar um samræmi ökutækja í notkun.“

6) Í stað liðar 3.1.0 kemur eftirfarandi:

„3.1.0. Kröfurnar í lið 2.1 skulu uppfylltar í ferð í þéttbýli og í allri PEMS-ferðinni, þar sem losun ökutækisins sem er prófað skal reiknuð út í samræmi við 4. og 6. viðbæti og skal ávallt vera jöfn og eða minni en gildið fyrir losun innan marka ($M_{RDE,k} \leq NTE_{pollutant}$).“

7) Liðir 3.1.0.1, 3.1.0.2 og 3.1.0.3 falla brott,

8) Í stað liðar 3.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.1.2. Ef viðurkenningaryfirvaldið er ekki sátt við athugun á gæðum gagna og niðurstöður úr fullgildingu á PEMS-prófun í samræmi við 1. og 4. viðbæti meðan á gerðarviðurkenningarprófunum stendur getur viðurkenningaryfirvaldið litið svo á að prófunin sé ógild. Í slíkum tilvikum skal viðurkenningaryfirvaldið skrá prófunargögnin og ástæðurnar fyrir ógildingu prófunarinnar.“

9) Í stað liðar 3.1.3 kemur eftirfarandi:

„3.1.3. Skýrslugjöf og miðlun upplýsinga um RDE-gerðarviðurkenningarprófanir.“

10) Í stað liðar 3.1.3.2.1. kemur eftirfarandi:

„3.1.3.2.1. Á vefsetrinu skal vera hægt að framkvæma leit með algildisstaf í undirliggjandi gagnagrunni á grundvelli eins eða fleira af eftirfarandi:

Gerð, tegundar, afbrigðis, útfærslu, verslunarheitis eða gerðarviðurkenningarnúmers eins og um getur í samræmisvottorðinu, skv. IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB.

Upplýsingarnar, sem lýst er hér á eftir, skulu gerðar aðgengilegar fyrir hvert ökutæki í einni leit:

— Auðkenni PEMS-prófunarhópsins sem ökutækið tilheyrir, í samræmi við 3. lið í gagnsæisskrá 1 sem sett er fram í töflu 1 í 5. viðbæti II. viðauka,

— uppgefin hámarksgildi fyrir losun í raunverulegum akstri, eins og þau eru skráð í lið 48.2 í samræmisvottorðinu, eins og lýst er í IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB.“

11) Í stað liðar 4.2 kemur eftirfarandi:

„4.2. Við gerðarviðurkenningu skal framleiðandi sýna viðurkenningaryfirvaldinu fram á að hið valda ökutæki, akstursmynstur þess, skilyrði og farmþungi séu dæmigerð fyrir PEMS-prófunarhópinn. Nota skal kröfur um farmþunga og umhverfisskilyrði, eins og er tilgreint í liðum 5.1 og 5.2, fyrir fram til að ákvarða hvort skilyrðin séu viðunandi fyrir RDE-prófun.

12) Í stað liðar 4.5 kemur eftirfarandi:

„4.5. Í því skyni að meta einnig losun frá ökutækjum í ferðum með heitræsingu skal prófa tiltekinn fjölda ökutækja úr hverjum PEMS-prófunarhópi, eins og tilgreint er í lið 4.2.8 í 7. viðbæti, án meðhöndlunar ökutækisins, eins og lýst er í lið 5.3, en þó með heitum hreyfli með hitastig á kælivökva og/eða hitastig á smurolíu sem er yfir 70 °C.“

13) Ákvæði liða 4.6 og 4.7 bætast við.

„4.6. Við RDE-prófanir sem gerðar eru við gerðarviðurkenningu getur gerðarviðurkenningaryfirvaldið sannprófað að uppsetning prófunar og sá búnaður sem er notaður uppfylli kröfurnar í 1. og 2. viðbæti, með beinni skoðun eða greiningu á sönnunargögnum (t.d. ljósmyndir, skrár).

4.7. Framleiðandi hugbúnaðartólsins eða gerðarviðurkenningarvald skal fullgilda hugbúnaðartólið sem er notað við sannprófun á marktæki ferðar og til að reikna út losun í samræmi við ákvæðin sem mælt er fyrir um í 4., 5. og 6. viðbæti og 7. viðbæti a og 7. viðbæti b uppfylli ákvæði. Ef slíkt hugbúnaðartól er gell inn í PEMS-mælitækið skal leggja fram sönnun fyrir fullgildingunni samhliða afhendingu mælitækisins.“

14) Í stað liða 5.4.1 og 5.4.2 kemur eftirfarandi:

„5.4.1. Athuga skal allt sem er ofaukið eða ófullnægjandi í hreyfifræði akstursins meðan á ferðinni stendur, með þeim aðferðum sem er lýst í 7. viðbæti a.

5.4.2. Ef niðurstöðurnar úr ferðinni teljast marktækar að loknum sannprófunum samkvæmt lið 5.4.1 skal beita aðferðunum sem mælt er fyrir um í 5. viðbæti, 7. viðbæti a og 7. viðbæti b til að sannprófa að prófunarskilyrðin hafi verið eðlileg.“

15) Í stað liðar 5.5.1 kemur eftirfarandi:

„5.5.1. Nota skal loftræstikerfið eða annan aukabúnað þannig að það samsvari því sem að jafnaði er fyrirhuguð notkun á þeim í raunverulegum akstri á vegi. Skjalfesta skal alla notkun. Gluggar ökutækisins skulu vera lokaðir þegar loftkælingin eða hitarinn eru í notkun.“

16) Í stað liða 5.5.2.2, 5.5.2.3 og 5.5.2.4 kemur eftirfarandi:

„5.5.2.2. Allar niðurstöður skulu leiðréttar með K_i-stuðlunum eða K_i-fráviksgildunum, sem eru ákvörðuð með aðferðunum í 1. viðbæti við 6. undirviðauka XXI. viðauka fyrir gerðarviðurkenningu ökutækja með kerfi sem endurnýja sig reglubundið. Beita skal K_i-stuðlinum eða K_i -fráviksgildinu á lokaniðurstöðurnar að loknu mati í samræmi við 6. viðbæti.

5.5.2.3. Ef losunin uppfyllir ekki kröfurnar í lið 3.1.0 skal sannprófa hvort endurnýjun eigi sér stað. Sannprófun á endurnýjun má byggjast á sérfræðiáliti með víxlfylgni nokkurra eftirfarandi merkja, sem geta m.a. verið mæling á hitastigi útblásturs, agnafjölda, koltvísýringi og súrefni (O_2) ásamt hraða og hröðun ökutækisins. Ef ökutækið hefur búnað til að greina endurnýjun sem tilgreindur er í gagnæisskrá 1 sem sett er fram í töflu 1 í 5. viðbæti við II. viðauka skal nota hann til að ákvarða hvort endurnýjun hafi átt sér stað. Framleiðandinn skal einnig tilgreina aðferðina sem nota þarf til að ljúka endurnýjuninni í gagnsæisskrá 1 sem sett er fram í töflu 1 í 5. viðbæti við II. viðauka. Framleiðandinn getur veitt ráðgjöf um hvernig eigi að greina að endurnýjun hafi átt sér stað ef slíkt merki er ekki fyrir hendi.

Ef endurnýjun átti sér stað á meðan á prófun stóð skulu niðurstöðurnar bornar saman við kröfurnar í lið 3.1.0 án þess að nota Ki-stuðulinn eða Ki-fráviksgildið. Ef losunin, sem af leiðir, uppfyllir ekki kröfurnar skal ógilda prófunina og endurtaka hana einu sinni. Áður en önnur prófunin hefst skal tryggja að lokið sé við endurnýjun og stöðgun með a.m.k. 1 klst. akstri. Önnur prófunin telst gild þó svo að endurnýjun fari fram þegar hún á sér stað.

5.5.2.4. Sannprófa má hvort endurnýjun eigi sér stað í samræmi við lið 5.5.2.3 hér að framan, jafnvel þó að ökutæki uppfylli kröfurnar í lið 3.1.0. Ef færa má sönnur fyrir endurnýjun, og með samþykki gerðarviðurkenningaryfirvaldsins, skulu endanlegar niðurstöður reiknaðar út án þess að nota Ki-stuðulinn eða Ki-fráviksgildið.“

17) Liðir 5.5.2.5 og 5.5.2.6 falla brott.

18) Nýr liður 5.5.3 bætist við:

„5.5.3. Heimilt er að tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu séu prófuð í hvaða valkvæða notkunarham sem er, þ.m.t. hamnum fyrir hleðslu rafgeymisins.“

19) Eftirfarandi liðir 5.5.4, 5.5.5 og 5.5.6 bætast við:

„5.5.4. Breytingar sem hafa áhrif á loftaflfræðilega eiginleika ökutækisins eru ekki leyfilegar að undanskilinni uppsetningu PEMS-kerfisins.

5.5.5. Ekki skal aka prófunarökutækjunum með það fyrir augum að þau annaðhvort standist prófunina eða ekki vegna öfgafullra akstursmynstra sem eru ekki dæmigerð fyrir venjuleg notkunarskilyrði. Ef þörf krefur má sannprófun á eðlilegum akstri byggjast á sérfræðiáliti sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, gerir eða lætur gera fyrir sína hönd með víxlfylgni nokkurra eftirfarandi merkja, sem geta m.a. verið útblástursstreymi, hiti útblásturs, mæling á koltvísýringi, súrefni (O_2), o.s.frv. ásamt hraða og hröðun ökutækis og GPS-gögnum þess og mögulega fleiri gagnaþáttum eins og snúningshraða hreyfils, gírstöðu, stöðu eldsneytisgjafar, o.s.frv.

5.5.6. Ökutækið skal vera í góðu vélfræðilegu ásigkomulagi og skal hafa verið tilkeyrt a.m.k. 3000 km áður en prófunin hefst. Skrá skal ekna kílómetra og aldur ökutækisins sem notað er við RDE-prófun.“

20) Í stað liðar 6.2 kemur eftirfarandi:

„6.2. Ferðin skal alltaf byrja á þéttbýlisakstri og því næst akstri í dreifbýli og á hraðbraut í samræmi við hlutföllin sem eru tilgreind í lið 6.6. Akstur í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut skal vera í samfelldri röð í samræmi við lið 6.12, en má einnig fela í sér ferð sem byrjar og endar á sama stað. Rjúfa má akstur í dreifbýli með stuttum tímabilum í þéttbýlisakstri þegar ekið er um þéttbýlissvæði. Rjúfa má akstur á hraðbraut með stuttum tímabilum þéttbýlis- eða dreifbýlisaksturs, t.d. þegar farið er fram hjá vegatollstöðvum eða svæðum þar sem vegavinna fer fram.“

21) Í stað liðar 7.6 kemur eftirfarandi:

„7.6. Við upphaf prófunarinnar eins og skilgreint er í lið 5.1 í 1. viðbæti skal ökutækið vera á hreyfingu innan 15 sekúndna. Stöðvun ökutækis á öllu kaldræsitímabilinu, eins það er skilgreint í 4. lið í 4. viðbæti, skal haldið í lágmarki og skal ekki vara lengur en 90 sekúndur í heild. Ef hreyfillinn drepur á sér meðan á prófuninni stendur er leyfilegt að endurræsa hann, en sýnataka skal ekki raskast. Ef hreyfillinn stöðvast meðan á prófuninni stendur skal sýnatakan ekki raskast.“

22) Í stað liðar 8.2 kemur eftirfarandi:

„8.2. Ef um er að ræða RDE-prófun með ófullnægjandi niðurstöðu skulu sýni tekin af eldsneyti, smurefni og hvarfmiðli (ef við á) og þau geymd í minnst 1 ár við skilyrði sem tryggja heilleika sýnanna. Henda má sýnum þegar þau hafa verið greind.“

23) Í stað liðar 9.2 kemur eftirfarandi:

„9.2. Sannprófa skal hvort að ferðin sé marktæk með þriggja þrepa aðferð sem hér segir:

ÞREP A: Ferðin samrýmist almennum kröfum, jaðarskilyrðum, kröfum varðandi ferðir og akstur og uppfylli forskriftir um smurolíu, eldsneyti og hvarfmiðla sem sett eru fram í 4. til 8. lið,

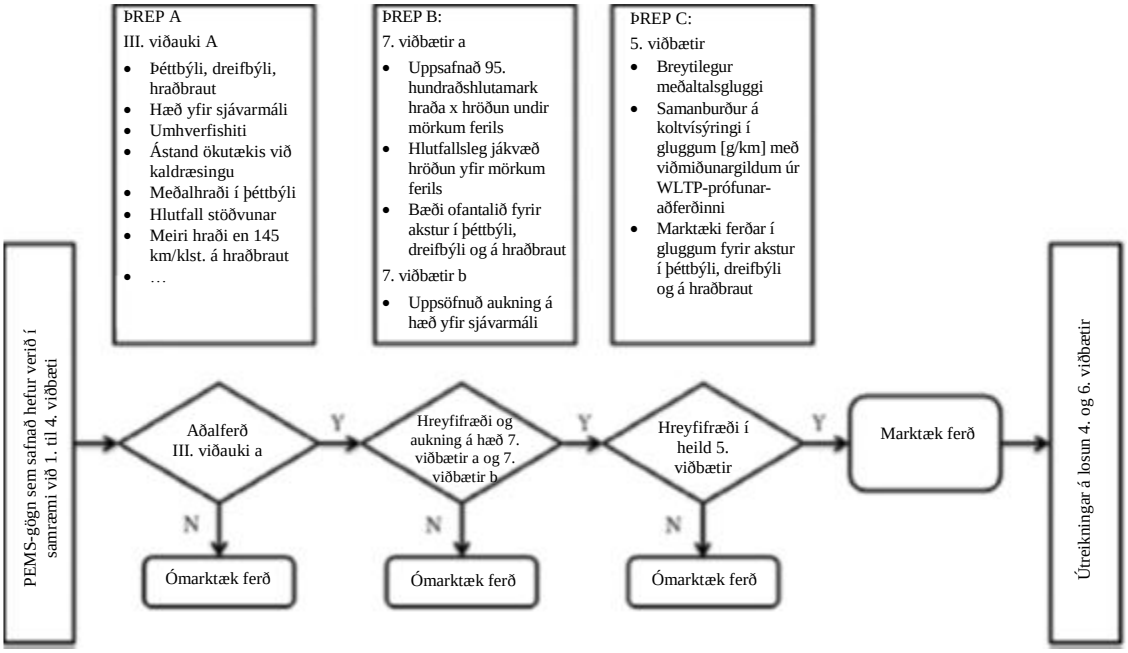
ÞREP B: Ferðin samrýmist kröfunum sem eru settar fram í 7. viðbæti a og 7. viðbæti b.

ÞREP C: Ferðin samrýmist kröfunum sem eru settar fram í 5. viðbæti.

Þrepum aðferðarinnar er lýst á mynd 1.

Mynd 1

Sannprófun á að ferð sé marktæk



Ef minnst ein af kröfunum er ekki uppfyllt skal ferðin teljast vera ómarktæk.“

24) Í stað liðar 9.4 kemur eftirfarandi:

„9.4. Þegar búið er að ákvarða hvort ferð telst gild í samræmi við lið 9.2 skal reikna út niðurstöður um losun með þeim aðferðum sem mælt er fyrir um í 4. og 6. viðbæti. Útreikningar á losun skulu gerðir á milli upphafs prófunar og loka prófunar eins og skilgreint er í 1. viðbæti, lið 5.1 annars vegar og lið 5.3 hins vegar.“

25) Í stað liðar 9.6 kemur eftirfarandi:

„9.6. Losun mengandi lofttegunda og fjöldi losaðra agna við kaldræsingu eins og er skilgreint í 4. lið í 4. viðbæti skulu tekin með í hefðundið mat í samræmi við 4., 5. og 6. viðbæti. Ef ökutækið hefur verið formeðhöndlað síðustu þrjár klukkustundirnar fyrir prófun við meðalhitastig sem fellur undir rýmkað svið í samræmi við lið 5.2, skulu ákvæði liðar 9.5 gilda um gögnin sem safnað er meðan á kaldræsitímabilinu stendur, jafnvel þó að akstursaðstæður séu ekki innan rýmkaða hitasviðsins.“

26) Ákvæðum 1. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað fyrstu málsgreinar liðar 3.2 kemur eftirfarandi:

„Prófunarmæliþættir sem eru tilgreindir í töflu 1 í þessum viðbæti skulu mældir við jafna tíðni sem er 1,0 Hz eða hærri og skráðir og tilkynntir við 1,0 Hz tíðni í samræmi við kröfurnar í 8. viðbæti. Ef mæliþættir frá rafstýrieiningu hreyfils eru aðgengilegir má afla þeirra á talsvert hærri tíðni, en skráningartíðnin skal vera 1,0 Hz. PEMS-greiningartækin, streymismælitækin og nemarnir skulu uppfylla kröfurnar sem mælt er fyrir um í 2. og 3. viðbæti.“

b) Í stað liðar 3.4.2 kemur eftirfarandi:

„3.4.2. Leyfilegur bakþrýstingur

Uppsetning og notkun PEMS-sýnatökunema skal ekki auka þrýstinginn við útblástursopið meira en þörf er á þannig að það geti mögulega haft áhrif á hversu dæmigerðar mælingarnar eru. Því er mælt með að einungis einum sýnatökunema sé komið fyrir á sama plani. Ef það er tæknilega mögulegt skulu framlengingar til að auðvelda sýnatöku eða tengingu við útblástursmassastreymismælinn hafa sama eða stærra þversniðsflatarmál og útblástursrörið.“

c) Í stað liðar 3.4.3 kemur eftirfarandi:

„3.4.3. Útblástursmassastreymismælir

Þegar útblástursmassastreymismælir er notaður skal hann festur við útblástursrör ökutækisins í samræmi við leiðbeiningar framleiðanda mælisins. Mælisvið útblástursmassastreymismælisins skal ná yfir það svið útblástursmassastreymis sem vænst er í prófuninni. Mælst er til þess að velja útblástursmassastreymismæli í því skyni að hafa hæsta streymi sem vænst er meðan á prófun stendur sem nær yfir minnst 75% af öllu sviði mælisins. Uppsetning útblástursmassastreymismælisins og hugsanlegra breytistykkja eða samtengja fyrir útblástursrör skal ekki hafa skaðleg áhrif á gang hreyfils eða eftirmeðferðarkerfis fyrir útblástursloft. Beggja vegna við íhlutinn sem nemur streymið skal setja minnst fjögur rörþvermál eða 150 mm af beinni leiðslu, allt eftir því hvort er stærra. Þegar verið er að prófa fjölstrokkahreyfil með kvíslaða útblástursgrein er mælt með því að staðsetja útblástursmassastreymismælinn fyrir neðan staðinn þar sem útblástursgreinarnar sameinast og stækka þversnið leiðslnanna svo að taka megi sýni frá sama þversniðsflatarmáli eða stærra. Heimilt er að nota mælingar á útblástursmassastreymi með nokkrum útblástursmassastreymismælum ef þetta er ekki gerlegt. Hinar mörgu mismunandi útfærslur á útblástursrörum, stærð þeirra og útblástursmassastreymi getur kallað á málamiðlanir sem stjórnast af góðu verkfræðilegu áliti þegar kemur að vali og uppsetningu á útblástursmassastreymismæli eða -mælum. Heimilt er að setja upp útblástursmassastreymismæli með minna þvermál en útblástursrörið eða samanlögð áætluð framhlið margra röra, að því tilskildu að það auki nákvæmni mælinga og hafi ekki skaðleg áhrif á notkun eða á eftirmeðferð útblásturslofts eins og er tiltekið í lið 3.4.2. Mælt er með því að skrásetja uppsetningu útblástursmassastreymismælis með ljósmyndum.“

d) Í stað þriðja undirliðar liðar 3.5 kemur:

„Ef hreyfillinn er búinn eftirmeðferðarkerfi fyrir útblástursloft skal útblásturssýnið tekið neðan við eftirmeðferðarkerfið. Þegar ökutæki með kvíslaðri útblástursgrein er prófað skal inntaki sýnatökunemans komið fyrir nægilega aftarlega í streyminu til að tryggja að sýnið sé dæmigert fyrir meðallosun frá öllum strokkum. Í fjölstrokkahreyflum með nokkra aðskilda hópa útblástursgreina, t.d. „V“-hreyflum, skal sýnatökuneminn staðsettur fyrir neðan staðinn þar sem útblástursgreinarnar sameinast. Heimilt er að nota sýnatöku á nokkrum stöðum þar sem er að finna vel blandað útblástursloft ef þetta er ekki tæknilega mögulegt. Í slíkum tilvikum skal fjöldi og staðsetning sýnatökunema samsvara útblástursmassastreymismælunum eins vel og mögulegt er. Ef um ójafnt útblástursstreymi er að ræða skal íhuga hlutfallslega sýnatöku eða sýnatöku með fleiri en einu greiningartæki.“

e) Í stað liðar 4.6 kemur eftirfarandi:

„4.6. Greiningartæki athugað með tilliti til mælingar á losun agna

Núllstaða greiningartækisins skal skráð með því að taka sýni af andrúmslofti, sem hefur verið síað með HEPA-síu á viðeigandi sýnatökupunkti, vanalega við inntak sýnatökurásar. Merkið skal skráð við stöðuga tíðni sem er margfeldi af 1,0 Hz í að meðaltali 2 mínútur og skal endanlegur styrkur vera í samræmi við forskriftir framleiðanda, en skal ekki fara yfir 5000 agnir á hvern rúmsentimetra.“

f) Í stað liðar 5.1 kemur eftirfarandi:

„5.1. Upphaf prófunar

Upphaf prófunar (sjá mynd viðb.1.1) skal skilgreina út frá annaðhvort:

— Þegar brunahreyfillinn er fyrst ræstur,

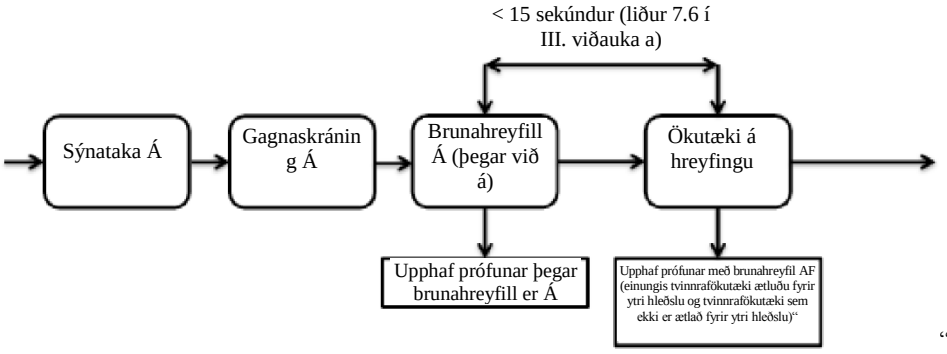
— eða fyrstu hreyfingu ökutækisins sem hefst með brunahreyfilinn ekki í gangi, á meiri hraða en 1 km/klst. fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu.

Sýnataka, mæling og skráning mæliþátta skal hefjast áður en prófunin hefst. Áður en prófunin hefst skal staðfesta að gagnaskráningartækið skrái alla nauðsynlega mæliþætti.

Til að auðvelda tímajöfnun er mælt með að skrá mæliþættina, sem þarf að tímajafna, annaðhvort með einu gagnaskráningartæki eða með samstilltum tímastimpli.

Mynd viðb.1.1.

Röðun á upphafi prófunar



g) í stað liðar 5.3 kemur eftirfarandi:

„5.3. Lok prófunar

Lokum prófunarinnar (sjá mynd viðb.1.2) er náð þegar ökutækið hefur lokið ferðinni og annaðhvort þegar:

— Slökkt er á brunahreyflinum,

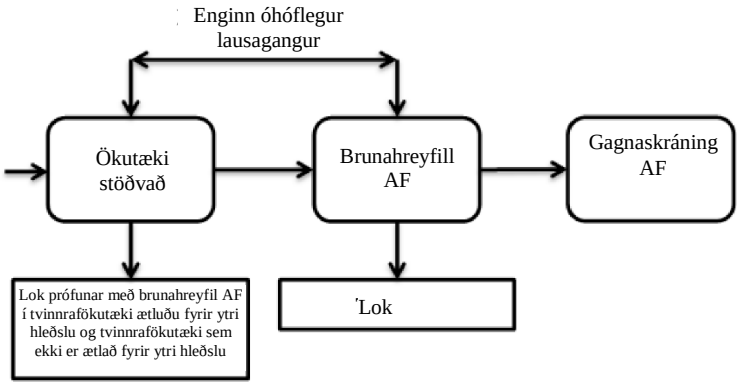
eða:

— fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, sem ljúka prófuninni með brunahreyfilinn ekki í gangi er ökutækið stöðvað og hraðinn er í mesta lagi 1 km/klst.

Forðast skal óhóflegan lausagang hreyfils eftir lok ferðarinnar. Gagnaskráning skal halda áfram þar til viðbragðstími sýnatökukerfanna er liðinn. Í tilviki ökutækja með merki sem gefur til kynna um að endurnýjun greinist (sjá 42. línu í gagnsæisskrá 1 í 5. viðbæti II. viðauka) skal athugun með innbyggða greiningarkerfinu framkvæmd og skjalfest strax eftir skráningu gagna og áður en ekið er lengra.

Mynd viðb.1.2.

Uppröðun í lok prófunar



“

h) Í stað liðar 6.3 kemur eftirfarandi:

„6.3. Athugun á mælingum á losun í vegaakstri

Sá styrkur af mælisviðskvörðunargasi sem var notaður við kvörðunina á greiningartækjunum í samræmi við lið 4.5 við upphaf prófunar skal ná yfir minnst 90% af gildunum fyrir styrk sem fæst úr 99% af mælingunni á gildum hlutum losunarprófunarinnar. Heimilt er að 1% af heildarfjölda mælinga sem eru notaðar við matið sé hærri en mælisviðskvörðunargasið, sem notað er, upp að stuðlinum tveimur. Ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar skal ógilda prófunina.“

27) Ákvæðum 2. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað f-liðar í lið 3.4.2 kemur eftirfarandi:

„f) Gildin sem verið er að meta og, ef þörf þykir, viðmiðunargildin, skulu skráð við stöðuga tíðni sem er margfeldi af 1,0 Hz, í 30 sekúndur.“

b) Í stað b- og e-liðar í lið 4.1.2 kemur eftirfarandi:

„b) staðfestingu á jafngildi við viðkomandi staðlað greiningartæki sem er tilgreint í lið 4.1.1 yfir það styrksvið mengunarefna og umhverfisskilyrði sem vænst er í gerðarviðurkenningarprófuninni, eins og er skilgreint í XXI. viðauka við þessa reglugerð sem og í fullgildingarprófun eins og er lýst í 3. lið 3. viðbætis fyrir ökutæki búið neistakveikju og þjöppukveikjuhreyfli; framleiðandi greiningartækisins skal sýna fram á marktækni jafngildis innan leyfilegra vikmarka sem eru gefin í lið 3.3 í 3. viðbæti,

e) staðfestingu á að áhrif frá titringi, hröðun og umhverfishita á aflestrartölu greiningartækisins fari ekki yfir kröfurnar um mælisuð fyrir greiningartæki sem settar eru fram í lið 4.2.4.“

c) Í stað liðar 4.2.4 kemur eftirfarandi:

„4.2.4. Mælisuð

Mælisuðið skal ekki fara yfir 2% af fulla kvarðaútslaginu. Á milli allra 10 mælingartímabilanna skal koma 30 sekúndna tímabil þar sem viðeigandi mælisviðskvörðunargas er leitt inn í greiningartækið. Á undan hverju sýnatökutímabili og hverju mælisviðstímabili skal nægjanlegur tími látinn líða til að tæma greiningartækið og sýnatökurásirnar.“

d) Í stað liðar 5.1 kemur eftirfarandi:

„5.1. Kvörðunar- og mælisviðslofttegundir vegna RDE-prófana

e) Eftirfarandi liðir 5.1.1, 5.1.2 og 5.1.3 bætast við:

„5.1.1. Almenn

Taka skal tillit til reglna um geymsluþol allra kvörðunar- og mælisviðskvörðunargastegunda. Hreint og blandað kvörðunargas og mælisviðskvörðunargas skal uppfylla nákvæmu skilgreiningarnar í 5. undirviðauka XXI. viðauka við þessa reglugerð.

5.1.2. NO_2-kvörðunargas

Að auki er heimilt að nota NO_2-kvörðunargas. Styrkur NO_2-kvörðunargassins skal vera minna en 2% frá yfirlýstu styrkgildi. Í NO_2-kvörðunargasinu skal magn NO ekki vera meira en 5% af NO_2-innihaldi þess.

5.1.3. Margþættar blöndur

Einungis skal nota margþættar blöndur sem uppfylla kröfurnar í lið 5.1.1. Þessar blöndur geta innihaldið tvo eða fleiri efnisþætti. Margþættar blöndur sem innihalda bæði köfnunarefniseinoxíð og köfnunarefnistvíoxíð eru undanþegnar kröfunni um óhreinindi í köfnunarefnistvíoxíði sem sett er fram í liðum 5.1.1 og 5.1.2.“

f) Í stað liðar 7.2.3 kemur eftirfarandi:

„7.2.3. Nákvæmni

Nákvæmni útblástursmassastreymismælisins, skilgreind sem frávik aflestrartölu hans frá viðmiðunarstreymisgildinu, skal ekki fara yfir ±3% af aflestrartölunni, 0,5% af fullu kvarðaútslagi eða ±1,0% af því hámarksstreymi sem útblástursmassastreymismælirinn var kvarðaður við, hver talan sem er hæst.“

g) Í stað liðar 7.2.5 kemur eftirfarandi:

„7.2.5. Mælisuð

Mælisuðið skal ekki fara yfir 2% af hæsta kvarðaða streymisgildinu. Á milli allra 10 mælingartímabilanna skulu koma 30 sekúndna tímabil þar sem útblástursmassastreymismælirinn er látinn verða fyrir mesta kvarðaða streymi.“

28) Ákvæðum 3. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað liða 3.2.2 og 3.2.3 kemur eftirfarandi:

„3.2.2. Prófunarskilyrði

Fullgildingarprófunin skal gerð á vegkefli, eftir því sem unnt er, við gerðarviðurkenningarskilyrði með því að fylgja kröfunum í XXI. viðauka við þessa reglugerð. Mælt er með að leiða útblástursstreymið sem PEMS-kerfið dregur út í fullgildingarprófuninni aftur inn í gassýnissafnarann. Ef það er ekki mögulegt skal leiðrétta

niðurstöðurnar frá gassýnissafnaranum fyrir útdregna útblástursmassann. Ef útblástursmassastreymið er fullgilt með útblástursmassastreymismæli er mælt með að milligáta massastreymismælingarnar með gögnum frá nema eða frá stýrieiningu hreyfilsins.

3.2.3. Greining gagna

Reikna skal sértæka heildarlosun miðað við vegalengd [g/km], sem er mæld með rannsóknarstofubúnaði, í samræmi við 7. undirviðauka XXI. viðauka. Losunin, sem er mæld með PEMS-kerfinu, skal reiknuð í samræmi við 9. lið 4. viðbætis, lögð saman til að fá út heildarmassa losunar mengandi efna [g] og síðan deilt í með prófunarvegalengdinni [km] sem fæst með vegkeflinu. Heildarmassi sértækrar losunar mengunarefna miðað við vegalengd [g/km], sem er ákvörðuð með PEMS-kerfinu og kerfi tilvísunarrannsóknarstofunnar, skal metin með hliðsjón af kröfunum sem eru tilgreindar í lið 3.3. Til að fullgilda mælingar á losun köfnunarefnisoxíðs skal beita rakaleiðréttingu samkvæmt 7. undirviðauka XXI. viðauka við þessa reglugerð.“

b) Í stað liða 4.1 og 4.2 kemur eftirfarandi:

„4.1. Tíðni fullgildingar

Auk þess að uppfylla kröfurnar um línuleika í 3. lið 2. viðbætis við stöðug skilyrði, skal fullgilda línuleika órekjanlegra útblástursmassastreymismæla eða útblástursmassastreymis sem er reiknað út frá órekjanlegum nemum eða mælimerkjum frá stýrieiningu hreyfils við óstöðug skilyrði fyrir hvert prófunarökutæki, miðað við kvarðaðan útblástursmassastreymismæli eða gassýnissafnarann.

4.2. Fullgildingaraðferð

Framkvæma skal fullgildinguna á vegkefli við skilyrði fyrir gerðarviðurkenningu, að því marki sem unnt er. Nota skal rekjanlega kvarðaðan streymismæli sem viðmiðun. Umhverfishiti má vera hvaða hitastig sem er innan þeirra marka sem eru tilgreind í lið 5.2 í þessum viðauka. Uppsetning útblástursmassastreymismælisins og framkvæmd prófunarinnar skulu uppfylla kröfuna í lið 3.4.3 í 1. viðbæti þessa viðauka.“

29) Ákvæðum 4. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað liðar 1 kemur eftirfarandi:

„1. INNGANGUR

Í þessum viðbæti er lýst aðferðinni við að ákvarða augnabliksmassa og fjölda losaðra agna [g/s; #/s] sem skal síðar nota við mat á ferð til mælingar á losun í raunverulegum akstri (RDE-ferð) og útreikning á endanlegri losunarniðurstöðu eins og lýst er í 6. viðbæti.“

b) Í stað annarrar málsgreinar liðar 3.2 kemur eftirfarandi:

„Tímaleiðrétta skal útblástursmassastreymi sem er mælt með útblástursmassastreymismæli með andhverfri hliðrun miðað við umbreytingartíma útblástursmassastreymismælisins. Ákvarða skal umbreytingartíma massastreymismælisins samkvæmt lið 4.4 í 2. viðbæti:“

c) Í stað 4. liðar kemur eftirfarandi:

„4. Kaldræsing

Kaldræsing að því er varðar RDE-prófun er tímabilið frá upphafi prófunarinnar fram að þeim tímapunkti þegar ökutækið hefur gengið í 5 mínútur. Ef hitastig kælivökvans er ákvarðað lýkur kaldræsitímabilinu þegar kælivökvinn er minnst 70 °C heitur í fyrsta skipti, en eigi síðar en þegar 5 mínútur eru liðnar frá því að prófunin hefst.“

d) Eftirfarandi liðir 8.3 og 8.4 bætast við:

„8.3. Leiðrétting á neikvæðum niðurstöðum um losun

Ekki skal leiðrétta neikvæðar millibilsniðurstöður. Neikvæðar lokaniðurstöður skal stilla á núll.

8.4. Leiðrétting vegna rýmkaðra skilyrða

Losunina á hverri sekúndu sem reiknuð er út í samræmi við þennan viðbæti má einungis taka og deila í með gildinu 1,6 í þeim tilvikum sem mælt er fyrir um í liðum 9.5 og 9.6.

Leiðréttingarstuðullinn 1,6 skal aðeins notaður einu sinni. Leiðréttingarstuðullinn 1,6 gildir um losun mengandi efna en ekki koltvísýring.“

30) Í stað 5. viðbætis kemur eftirfarandi:

„5. viðbætir

Sannprófun á hreyfifræði ferðar í heild með því að nota aðferðina þar sem notaður er breytilegur meðaltalsgluggi

1. **Inngangur**

Aðferðin þar sem notaður er breytilegur meðaltalsgluggi er notuð til að sannprófa hreyfifræði ferðar í heild Prófunin skiptist í undirþætti (glugga) og tölfræðilega úrvinnslan sem á eftir kemur hefur þann tilgang að ákvarða hvort ferðin er marktæk að því er varðar RDE-prófun. „Eðlileiki“ glugganna er ákvarðaður með því að bera saman sértæka koltvísýringslosun þeirra við viðmiðunarferli sem fengið er úr koltvísýringslosun ökutækis sem er mælt í samræmi við WLTP-prófunaraðferðina.

2. **Tákn, mæliþættir og einingar**

Stuðull (i) vísar til tímaþrepsins

Stuðull (j) vísar til gluggans

Stuðull (k) vísar til flokksins (t = heildin, u = þéttbýli, r = dreifbýli, m = hraðbraut) eða til einkennandi koltvísýringsferils (cc)

Δ — mismunur

$\geq$ — stærri eða jafn og

— fjöldi

% — hundraðshlutfall

$\leq$ — minni en eða jafn og

a_1, b_1 — reiknistuðlar einkennandi koltvísýringsferilsins

a_2, b_2 — reiknistuðlar einkennandi koltvísýringsferilsins

M_{CO_2} — massi koltvísýrings [g]

$M_{CO_2,j}$ — Massi koltvísýrings í glugga j, [g]

t_i — heildartími í þrepi i, [s]

t_t — tímalengd prófunar, [s]

v_i — raunhraði ökutækis í tímaþrepi i, [km/klst.]

$\bar{v}_j$ — meðalhraði ökutækis í glugga j, [km/klst.]

tol_{1H} — efri vikmörk fyrir einkennandi koltvísýringsferil ökutækisins, [%]

tol_{1L} — neðri vikmörk fyrir einkennandi koltvísýringsferil ökutækisins, [%]

3. **Breytilegir meðaltalsgluggar**

3.1. *Skilgreining á meðaltalsgluggum*

Augnablikslosunin, sem er reiknuð í samræmi við 4. viðbæti, skal heilduð með aðferð þar sem notaður er breytilegur meðaltalsgluggi, á grunni viðmiðunarmassa koltvísýringsins.

Reikniregla er sem hér segir: Sértæk massalosun koltvísýrings miðað við vegalengd meðan á losun í raunverulegum akstri stendur er ekki reiknuð fyrir allt gagnamengið heldur fyrir undirmengi þess, og er lengd undirmengjanna ákvörðuð þannig að þau samsvari ávallt sama þætti af massalosun koltvísýrings frá ökutækinu sem mæld er í WLTP-prófunarlotu. Útreikningur á breytilegum gluggum er gerður með Δt millibili sem samsvarar

gagnasöfnunartíðninni. Í eftirfarandi liðum er vísað til undirmengjanna, sem notuð eru til að reikna koltvísýringslosun ökutækis í vegaakstri og meðalhraða þess, sem „meðaltalsglugga“.

Keyra má útreikninginn, sem er lýst í þessum lið, frá fyrsta gagnapunkti (áfram).

Eftirfarandi gögn skulu ekki tekin með í útreikninginn á massa koltvísýrings, fjarlægðinni og meðalhraða ökutækisins í meðaltalsgluggunum:

— Reglubundin sannprófun mælitækja og/eða eftir sannprófanir núllreks,

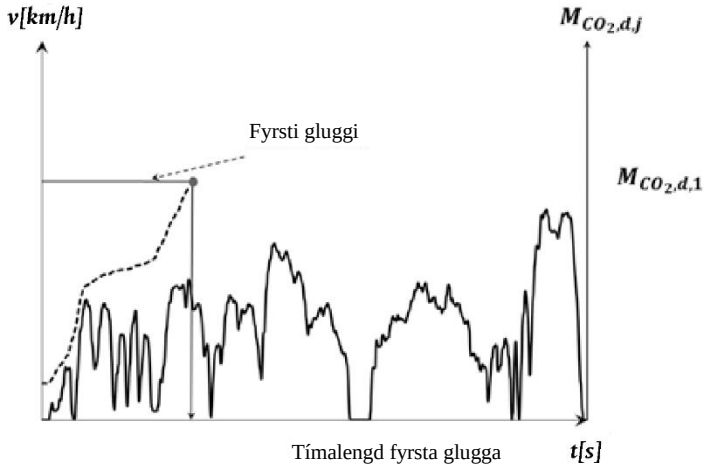
— jarðhraði ökutækis er minni en 1 km/klst.

Útreikningurinn skal hefjast þegar jarðhraði ökutækis er 1 km/klst. eða meiri og skal ná til viðburða í akstri þar sem engin koltvísýringslosun á sér stað og jarðhraði ökutækisins er 1 km/klst. eða meiri.

Ákvarða skal massalosunina $M_{CO_2,j}$ með því að heilda augnablikslosunina í g/s eins og er tilgreint í 4. viðbæti þessa viðauka.

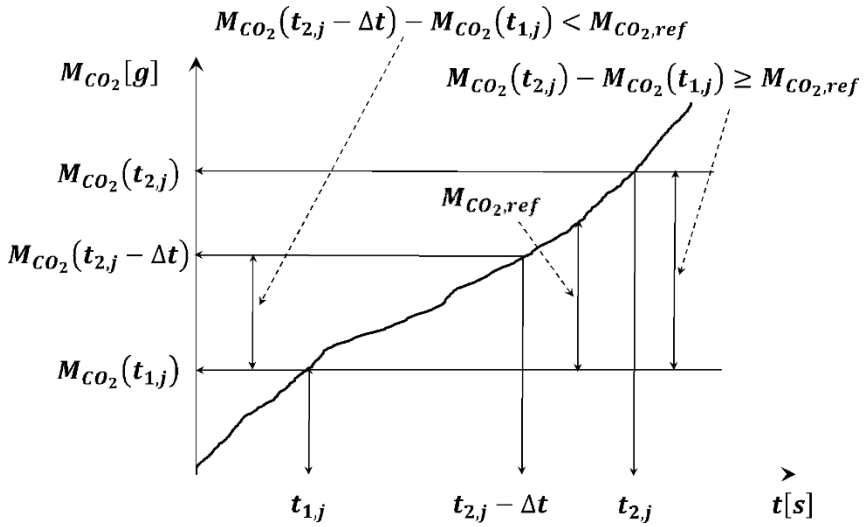
Mynd 1

Hraði ökutækis á móti tíma - Meðaltalslosun ökutækis á móti tíma, frá fyrsta meðaltalsglugga



Mynd 2

Skilgreining á massa koltvísýrings á grunni meðaltalsglugga



Tímalengd ($t_{2,j} - t_{1,j}$) j[unda] meðaltalsgluggans er ákvörðuð með:

$$M_{CO_2}(t_{2,j}) - M_{CO_2}(t_{1,j}) \geq M_{CO_2,ref}$$

Þar sem:

$M_{CO_2}(t_{i,j})$ er massi koltvísýrings sem er mældur frá byrjunartíma prófunar að tíma ti,j, [g],

$M_{CO_2,ref}$ er helmingurinn af koltvísýringsmassanum sem ökutækið losar við WLTP-prófunina sem gerð er í samræmi við 6. undirviðauka við XXI. viðauka þessarar reglugerðar.

Meðan á gerðarviðurkenningu stendur skal viðmiðunargildi koltvísýrings tekið úr WLTP-prófuninni sem framkvæmd er við gerðarviðurkenningarprófun á einstökum ökutækjum.

Að því er varðar prófun á samræmi ökutækja í notkun skal viðmiðunarmassi koltvísýrings fenginn úr 12. lið gagnsæisskráar 1 í 5. viðbæti II. viðauka með innreikningi milli ökutækis H og ökutækis L (ef við á) eins og skilgreint er í 7. undirviðauka XXI. viðauka með því að nota prófunarmassann og ökumótstöðustuðlana (f0, f1 og f2) sem fengnir eru úr samræmisvottorði einstaka ökutækisins eins og skilgreint er í IX. viðauka. Gildið fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal fengið úr WLTP-prófun sem gerð er í hleðsluham.

$t_{2,j}$ skal valið þannig að:

$$M_{CO_2}(t_{2,j} - \Delta t) - M_{CO_2}(t_{1,j}) < M_{CO_2,ref} \leq M_{CO_2}(t_{2,j}) - M_{CO_2}(t_{1,j})$$

Þar sem Δt er gagnasöfnunartíminn.

Koltvísýringsmassarnir $M_{CO_2,j}$ í gluggunum eru reiknaðir með því að heilda augnablikslosunina sem er reiknuð eins og er tilgreint í 4. viðbæti þessa viðauka.

3.2. *Útreikningur á mæliþáttum í glugga*

Reikna skal eftirfarandi atriði fyrir hvern glugga sem er ákvarðaður í samræmi við lið 3.1.

— Sértæk koltvísýringslosun miðað við vegalengd $M_{CO_2,d,j}$,

— Meðalhraði ökutækis $\bar{v}_j$.

4. **Mat á gluggum**

4.1. *Inngangur*

Hreyfifræðileg viðmiðunarskilyrði prófunarökutækisins eru skilgreind með tilliti til koltvísýringslosunar þess á móti meðalhraða sem er mældur við gerðarviðurkenningu með prófun 1 og er getið sem „einkennandi koltvísýringsferils ökutækisins“. Til að sértæk koltvísýringslosun miðað við vegalengd fáist skal ökutækið prófað í WLTP-prófunarlotu í samræmi við XXI. viðauka við þessa reglugerð.

4.2. *Viðmiðunarpunktar einkennandi koltvísýringsferils*

Sértæk koltvísýringslosun miðað við vegalengd sem taka skal tillit til í þessari málsgrein vegna skilgreiningarinnar á viðmiðunarferlinu skal fengin úr 12. lið gagnsæisskráar 1 í 5. viðbæti II. viðauka með innreikningi milli ökutækis H og ökutækis L (ef við á) eins og skilgreint er í 7. undirviðauka XXI. viðauka með því að nota prófunarmassa og ökumótstöðustuðla (f0, f1 og f2) sem fengnir eru úr samræmisvottorði einstaka ökutækisins eins og skilgreint er í IX. viðauka. Gildið fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal fengið með WLTP-prófunaraðferð sem gerð er í hleðsluham.

Meðan á gerðarviðurkenningu stendur skulu gildin tekin úr WLTP-prófuninni sem framkvæmd er við gerðarviðurkenningarprófun á einstaka ökutækinu.

Viðmiðunarpunktarnir P_1, P_2 og P_3 sem þarf til að skilgreina einkennandi koltvísýringsferil ökutækisins skulu fundnir sem hér segir:

4.2.1. **Liður P_1**

$\overline{v_{P1}}$ = 18,882 *km/klst.* (meðalhraðinn í lághraðafasa prófunarlotunnar fyrir létt ökutæki sem er samræmd á heimsvísu)

M_{CO_2,d,P_1} = losun ökutækisins á koltvísýringi í lághraðafasa WLTP-prófunarlotunnar [g/km]

4.2.2. **Liður P_2**

$\overline{v_{P2}}$ = 56,664 *km/klst.* (meðalhraðinn á háhraðafasa prófunarlotunnar fyrir létt ökutæki sem er samræmd á heimsvísu)

M_{CO_2,d,P_2} = losun ökutækisins á koltvísýringi í háhraðafasa WLTP-prófunarlotunnar [g/km]

4.2.3. **Liður P_3**

$\overline{v_{P3}}$ = 91,997 *km/klst.* (meðalhraðinn á hæsta hraðafasa prófunarlotunnar fyrir létt ökutæki sem er samræmd á heimsvísu)

M_{CO_2,d,P_3} = losun ökutækisins á koltvísýringi í hæsta hraðafasa WLTP-prófunarlotunnar [g/km]

4.3. *Skilgreining á einkennandi koltvísýringsferli*

Losun í einkennandi koltvísýringsferli er reiknuð út frá viðmiðunarpunktunum sem eru skilgreindir í lið 4.2, sem fall af meðalhraða með tveimur línulegum þáttum (P_1, P_2) og (P_2, P_3). Þátturinn (P_2, P_3) takmarkast við 145 km/klst. á hraðaás ökutækisins. Einkennandi ferillinn er skilgreindur með jöfnum sem hér segir:

Fyrir þáttinn (P_1, P_2):

$$M_{CO_2,d,CC}(\bar{v}) = a_1\bar{v} + b_1$$

með: $a_1 = \left(M_{CO_2,d,P_2} - M_{CO_2,d,P_1}\right)/(\overline{v_{P2}} - \overline{v_{P1}})$

og: $b_1 = M_{CO_2,d,P_1} - a_1\overline{v_{P1}}$

Fyrir þáttinn (P_2, P_3):

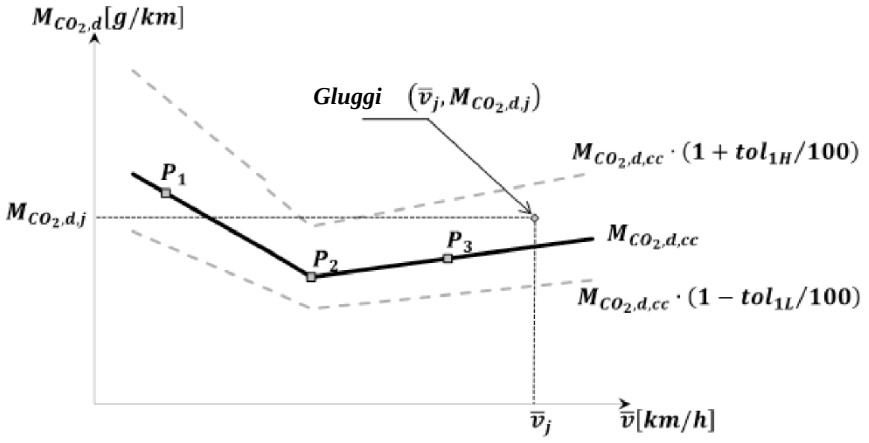
$$M_{CO_2,d,CC}(\bar{v}) = a_2\bar{v} + b_2$$

með: $a_2 = \left(M_{CO_2,d,P_3} - M_{CO_2,d,P_2}\right)/(\overline{v_{P3}} - \overline{v_{P2}})$

og: $b_2 = M_{CO_2,d,P_2} - a_2\overline{v_{P2}}$

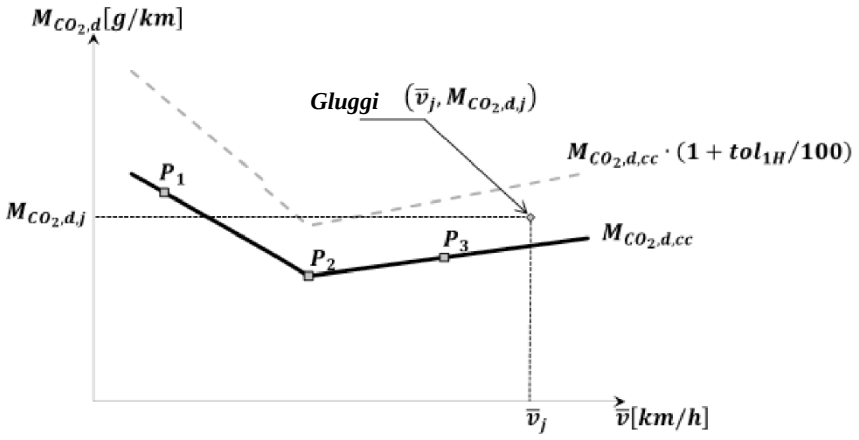
Mynd 3

Einkennandi koltvísýringsferill ökutækis og vikmörk fyrir ökutæki með brunahreyfil og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu



Mynd 4

Einkennandi koltvísýringsferill ökutækis og vikmörk fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu



4.4. *Gluggar fyrir akstur í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut*

4.4.1. **Gluggar í þéttbýli**

Gluggar fyrir akstur í þéttbýli einkennast af meðalhraða ökutækis $\bar{v}_j$ undir 45 km/klst.

4.4.2. **Gluggar í dreifbýli**

Gluggar fyrir akstur í dreifbýli einkennast af meðalhraða ökutækis $\bar{v}_j$ frá og með 45 km/klst. og undir 80 km/klst.

Fyrir ökutæki í flokki N2 sem eru með búnað sem takmarkar hraða við 90 km/klst., í samræmi við tilskipun 92/6/EBE, einkennast gluggar í dreifbýli af meðalhraða ökutækis $\bar{v}_j$ sem er undir 70 km/klst.

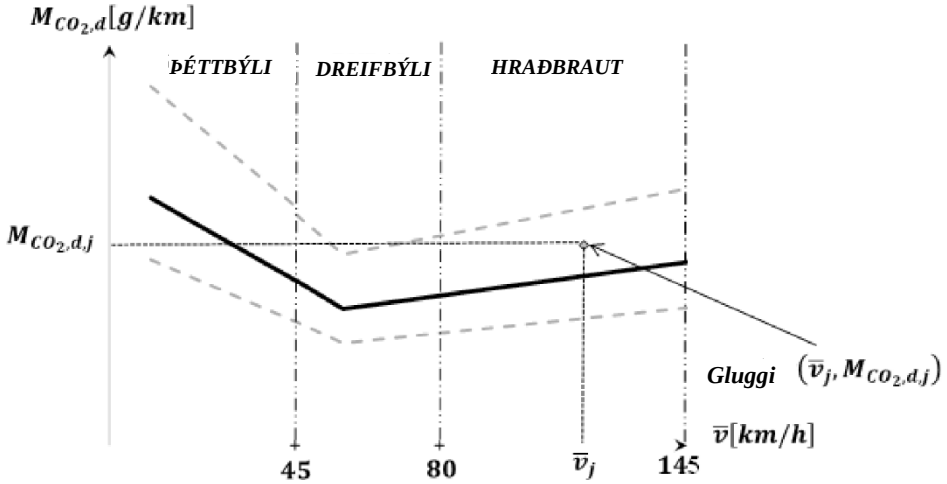
4.4.3. **Gluggar á hraðbraut**

Gluggar fyrir akstur á hraðbraut einkennast af meðalhraða ökutækis $\bar{v}_j$ frá og með 80 km/klst. og upp að 145 km/klst.

Fyrir ökutæki í flokki N2 sem eru með búnað sem takmarkar hraða við 90 km/klst., í samræmi við tilskipun 92/6/EBE, einkennast gluggar á hraðbraut af meðalhraða ökutækis $\bar{v}_j$ frá og með 70 km/klst. og upp að 90 km/klst.

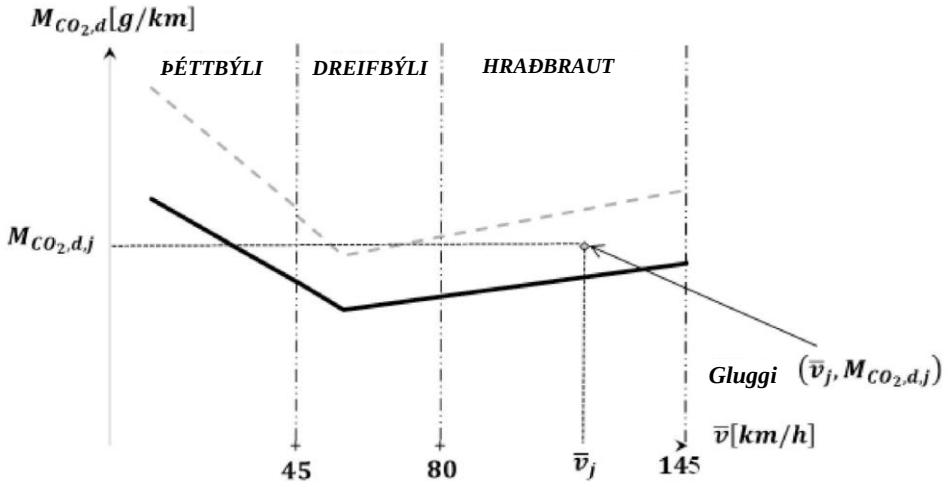
Mynd 5

Einkennandi koltvísýringsferill ökutækis: skilgreiningar á akstri í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut (myndskýring fyrir ökutæki með brunahreyfil og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu að undanskildum ökutækjum í flokki N2 sem eru útbúin með búnaði sem takmarkar hraða ökutækisins við 90 km/klst. í samræmi við tilskipun 92/6/EBE)



Mynd 6

Einkennandi koltvísýringsferill ökutækis: skilgreiningar á akstri í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut (myndskýring fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu að undanskildum ökutækjum í flokki N2 sem eru útbúin með búnaði sem takmarkar hraða ökutækisins við 90 km/klst. í samræmi við tilskipun 92/6/EBE)



4.5. *Sannprófun á að ferð sé marktæk*

4.5.1. **Vikmörk umhverfis einkennandi koltvísýringsferil ökutækisins**

Efri vikmörkin í einkennandi koltvísýringsferli ökutækisins eru tol_{1H} = 45% fyrir akstur í þéttbýli og tol_{1H} = 40% fyrir akstur í dreifbýli og á hraðbraut.

Lægri vikmörkin í einkennandi koltvísýringsferli ökutækisins eru tol_{1L} = 25% fyrir ökutæki með brunahreyfil og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tol_{1L} = 100% fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu.

4.5.2. **Sannprófun á marktæki prófunarinnar**

Prófunin er marktæk þegar minnst 50% glugganna fyrir akstur í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut eru innan vikmarkanna sem eru skilgreind fyrir einkennandi koltvísýringsferilinn.

Ef lágmarkskrafan um 50% milli tol_{1H} and tol_{1L} er ekki uppfyllt fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er heimilt að hækka efri jákvæðu vikmörkin tol_{1H} í 1% skrefum þar til 50% markmiðinu er náð. Þegar þessi tilhögun er notuð skal gildið tol_{1H} aldrei vera hærra en 50%.“

31) Í stað 6. viðbætis kemur eftirfarandi:

„6. viðbætir

ÚTREIKNINGUR Á LOKANIÐURSTÖÐUM LOSUNAR Í RAUNVERULEGUM AKSTRI

1. **Tákn, mæliþættir og einingar**

Stuðull (k) vísar til flokksins (t = heildin, u = þéttbýli, 1–2 = fyrstu tveir fasar í WLTP-prófunarlotu)

IC_k	er hlutfall vegalengdar þar sem brunahreyfillinn er notaður í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$d_{ICE,k}$	er ekin vegalengd [km] með brunahreyfilinn í gangi í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$d_{EV,k}$	er ekin vegalengd [km] með brunahreyfilinn ekki í gangi í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$M_{RDE,k}$	er endanlegur massi sértækrar losunar á loftkenndum mengunarefnum miðað við vegalengd í raunverulegum akstri [mg/km] eða fjöldi agna [#/km]
$m_{RDE,k}$	er massi sértækrar losunar loftkenndra mengunarefna [mg/km] eða fjölda agna [#/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í gegnum alla RDE-ferðina og áður en nokkurs konar leiðrétting hefur verið gerð í samræmi við þennan viðbæti

$M_{CO_2RDE,k}$ er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í allri RDE-ferðinni

$M_{CO_2WLTC,k}$ er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í allri WLTC-lotunni

$M_{CO_2WLTC\_CS,k}$ er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í allri WLTC-lotunni, frá tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu sem prófað er í hleðsluham þess

r_k hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist við RDE-prófunina og WLTP-prófunina

RF_k er niðurstöðumatstuðullinn sem er reiknaður út fyrir RDE-ferðina

RF_{L1} er fyrsti mæliþáttur fallsins sem notað er til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn

RF_{L2} er annar mæliþáttur fallsins sem notað er til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn

2. **Útreikningur lokaniðurstöðu losunar í raunverulegum akstri**

2.1. *Inngangur*

Sannprófa skal að ferðin sé marktæk í samræmi við lið 9.2 í III. viðauka A. Fyrir marktækar ferðir eru endanlegar niðurstöður losunar í raunverulegum akstri reiknaðar út á eftirfarandi máta fyrir ökutæki með brunahreyfil, tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu.

Í allri RDE-ferðinni og í hluta RDE-ferðarinnar sem er farinn í þéttbýli (k = t = heildin, k = u = þéttbýli):

$M_{RDE,k} = m_{RDE,k} \cdot RF_k$

Gildi mæliþáttanna RF_{L1} og RF_{L2} í fallinu sem er notað til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn eru sem hér segir:

— Óski framleiðandinn þess, þá einungis að því er varðar gerðarviðurkenningar sem veittar eru fyrir 1. janúar 2020,

RF_{L1} = 1,20 og RF_{L2} = 1,25,

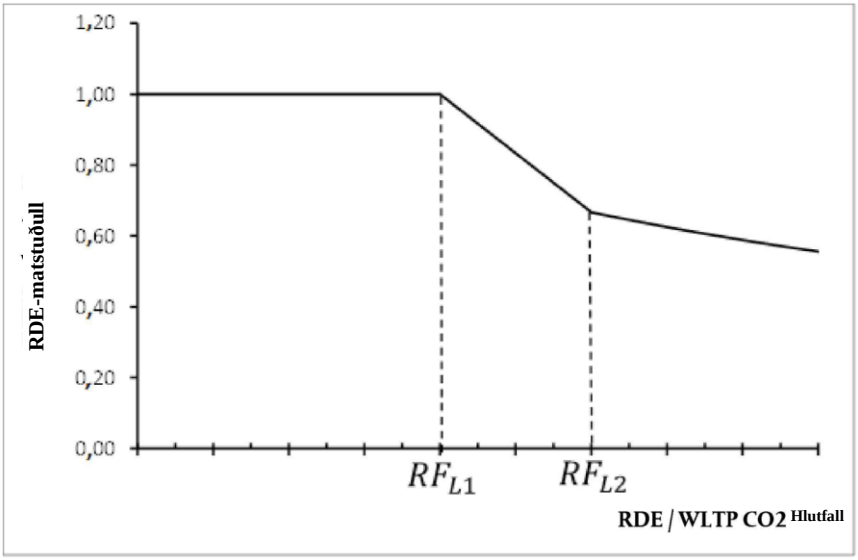
Í öllum öðrum tilvikum:

RF_{L1} = 1,30 og RF_{L2} = 1,50,

Niðurstöðumatstuðlar losunar í raunverulegum akstri RF_k (k = t = heildin, k = u = þéttbýli) skulu fengnir með því að nota þá ferla sem mælt er fyrir um í lið 2.2 fyrir ökutæki með brunahreyfil og í lið 2.3 fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu. Þessir matstuðlar skulu vera háðir endurskoðun af hálfu framkvæmdastjórnarinnar og skulu endurskoðaðir með tilliti til tækniframfara. Myndræn útfærsla á aðferðinni er sett fram á mynd viðb. 6.1 hér á eftir og stærðfræðiformúlurnar eru í töflu viðb. 6.1:

Mynd viðb. 6.1.

Fall til að reikna út niðurstöðumatstuðul



Tafla viðb. 6.1

Útreikningur á niðurstöðumatstuðlum

Ef:	Þá er niðurstöðumatstuðulinn *RFk*:	Þar sem:
$r_k \leq RF_{L1}$	$RF_k = 1$	
$RF_{L1} < r_k \leq RF_{L2}$	$RF_k = a_1 r_k + b_1$	$a_1 = \frac{RF_{L2} - 1}{[RF_{L2}(RF_{L1} - RF_{L2})]}$ $b_1 = 1 - a_1 RF_{L1}$
$r_k > RF_{L2}$	$RF_k = \frac{1}{r_k}$	

2.2. *Niðurstöðumatstuðull RDE-prófunar fyrir ökutæki með brunahreyfil og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu*

Gildið fyrir niðurstöðumatstuðul RDE-prófunar fer eftir hlutfallinu r_k milli sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd sem mælist í RDE-prófuninni og sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd, sem ökutækið losar frá sér í WLTP-prófun sem gerð er í samræmi við 6. undirviðauka XXI. viðauka við þessa reglugerð, sem fengin er úr 12. lið gagnsæisskráar 1 í 5. viðbæti II. viðauka með innreikningi milli ökutækis H og ökutækis L (ef við á) eins og skilgreint er í 7. undirviðauka XXI. viðauka með notkun prófunarmassa og ökumótstöðustuðla (F0, F1 og F2) sem fengnir eru úr samræmisvottorði einstaka ökutækisins eins og skilgreint er í IX. viðauka. Viðeigandi fasar í akstursloturn WLTP-prófunarinnar skulu vera sem hér segir með tilliti til losunar í þéttbýli:

a) varðandi ökutæki með brunahreyfil, fyrstu tveir fasar WLTP-prófunarinnar, þ.e. lághraðafasinn og miðhraðafasinn,

b) varðandi tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, öll akstursloturn WLTP-prófunarinnar.

$$r_k = \frac{M_{CO_2,RDE,k}}{M_{CO_2,WLTP,k}}$$

2.3. *Niðurstöðumatstuðull RDE-prófunar fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu*

Gildið fyrir niðurstöðumatstuðul RDE-prófunar fer eftir hlutfallinu r_k milli sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd sem mælist í RDE-prófuninni og sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd, sem ökutækið losar frá sér í gegnum WLTP-prófun sem gerð er í hleðsluham, í samræmi við 6. undirviðauka XXI. viðauka við þessa reglugerð, sem fengin er úr 12. lið gagnsæisskráar 1 í 5. viðbæti II. viðauka með innreikningi milli ökutækis H og ökutækis L (ef við á) eins og skilgreint er í 7. undirviðauka XXI. viðauka með notkun prófunarmassa og ökumótstöðustuðla (F0, F1 og F2) sem fengnir eru úr samræmisvottorði einstaka ökutækisins eins og skilgreint er í IX. viðauka. Hlutfallið r_k er leiðrétt með hlutfalli sem endurspeglar notkunina á brunahreyfli í RDE-ferðinni og í WLTP-prófuninni sem ljúka á með því að nota hleðsluhaminn. Formúlan hér á eftir skal vera háð endurskoðun af hálfu framkvæmdastjórnarinnar og skal endurskoðuð vegna tækniframfara.

Varðandi annað hvort akstur í þéttbýli eða heildarakstur:

$$r_k = \frac{M_{CO_2,RDE,k}}{M_{CO_2,WLTP,k-CS,t}} \cdot \frac{0{,}85}{IC_k}$$

þar sem IC_k er hlutfallið af vegalengd með brunahreyfilinn í gangi í annað hvort akstri í þéttbýli eða í heildarakstri, deilt með heildarvegalengdinni í akstri í þéttbýli eða í heildarakstri:

$$IC_k = \frac{d_{ICE,k}}{d_{ICE,k} + d_{EV,k}}$$

Með ákvörðun á notkun brunahreyfils í samræmi við 5. lið 4. viðbætis.“

32) Ákvæðum 7. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað 1. liðar kemur eftirfarandi:

„1. INNGANGUR

Vegna sérkenna PEMS-prófana skal þess ekki krafist að þær séu framkvæmdar á hverri gerð ökutækis með tilliti til losunar og upplýsinga um viðgerðir og viðhald ökutækja eins og er skilgreint í 1. lið 2. gr., sem hér á eftir nefnist „losunargerð ökutækis.“ Framleiðanda ökutækis er heimilt að flokka saman nokkrar losunargerðir

ökutækja og nokkur ökutæki með mismunandi uppgefin hámarksgildi fyrir losun í raunverulegum akstri í samræmi við I. hluta IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB, til að mynda PEMS-prófunarhóp samkvæmt kröfunum í 3. lið, sem skal fullgilda samkvæmt kröfunum í 4. lið.“

b) Liður 4.2.6 fellur brott.

c) Í stað skýringar 2 í töflunni í lið 4.2.8 kemur eftirfarandi:

„(2) Þegar aðeins ein losunargerð ökutækja er í PEMS-prófunarhópi skal gerðarviðurkenningaryfirvaldið ákveða hvort að ökutækið skuli prófað við heit- eða kaldræsingu.“

d) Í stað liðar 5.3 kemur eftirfarandi:

„5.3. Yfirvaldið og framleiðandi ökutækjanna skulu halda skrá yfir losunargerðir ökutækja sem eru hlutar af tilteknum PEMS-prófunarhópi, á grunni gerðarviðurkenninganúmera. Fyrir hverja losunargerð skal einnig gefa upp samsvarandi samsetningu á gerðarviðurkenningarnúmerum, gerðum, afbrigðum og útfærslum eins og er skilgreint í lið 0.2 í EB-samræmisvottorði ökutækisins.“

33) Ákvæðum 7. viðbætis a er breytt sem hér segir:

a) Í stað fyrirsagnarinnar kemur eftirfarandi:

„7. viðbætir a

Sannprófun á hreyfifræði ferðar“

b) Í stað 1. liðar kemur eftirfarandi:

„1. Inngangur

Í þessum viðbæti er lýst reikniaðferðum til að sannprófa hreyfifræði ferðar með því að ákvarða hverju er ofaukið eða hvað vantar upp á í hreyfifræði aksturs í þéttbýli, dreifbýli og á hraðbraut.“

c) Í stað liðar 3.1.1 kemur:

„3.1.1. Forvinnsla gagna

Kvikir mæliþættir eins og hröðun ($v \cdot a_{pos}$) eða RPA skulu ákvarðaðir með hraðamerki með 0,1% nákvæmni fyrir öll hraðagildi yfir 3 km/klst. og 1 Hz sýnatökutíðni. Þessi krafa um nákvæmni er almennt uppfyllt með merkjum sem kvörðuð eru út frá vegalengd og eru fengin frá (snúnings-) hraðanema á hjóli. Annars skal ákvarða hröðunina með 0,01 m/s^2 nákvæmni og 1 Hz sýnatökutíðni. Aðskilda hraðamerkið í ($v \cdot a_{pos}$) skal í því tilviki hafa minnst 0,1 km/klst. nákvæmni.

Réttur hraðaferill byggir upp grunn að frekari útreikningum og flokkun eins og er lýst í liðum 3.1.2 og 3.1.3.“

d) Í stað liðar 3.1.3 kemur eftirfarandi:

„3.1.3 Flokkun niðurstaðna

Þegar búið er að reikna a_i og $(v \cdot a)_i$, skal raða gildunum v_i, d_i, a_i and $(v \cdot a)_i$ í hækkandi röð eftir hraða ökutækisins.

Öll gagnamengi þar sem $v_i \leq 60$ km/klst. tilheyra þéttbýlishraðaflokknum, öll gagnamengi þar sem 60 km/klst. $< v_i \leq 90$ km/klst. tilheyra dreifbýlishraðaflokknum og öll gagnamengi þar sem $v_i > 90$ km/klst. tilheyra hraðbrautarhraðaflokknum.

Varðandi ökutæki í flokki N2 sem eru útbúin með búnaði sem takmarkar hraða ökutækisins við 90 km/klst. tilheyra öll gagnamengi með $v_i \leq 60$ km/klst. hraðaflokkinum "þéttbýli“, öll gagnamengi með 60 km/klst. $< v_i \leq 80$ km/klst. tilheyra hraðaflokkinum „dreifbýli“ og öll gagnamengi með $v_i > 80$ km/klst. tilheyra hraðaflokkinum „hraðbraut“.

Fjöldi gagnamengja með hröðunargildi þar sem $a_i > 0{,}1$ m/s^2 skal vera meiri en eða jafn og 100 í hverjum hraðaflokki.

Reikna skal meðalhraða ökutækisins $\bar{v}_k$ fyrir hvern hraðaflokk sem hér segir:

$$\bar{v}_k = \left(\sum_i v_{i,k}\right)/N_k,\ i = 1 \text{ to } N_k,\ k = u, r, m$$

Þar sem:

N_k er heildarfjöldi sýna úr þéttbýlis-, dreifbýlis- og hraðbrautarhlutunum.“

e) Í lið 4.1.1 bætist eftirfarandi við:

„Óski framleiðandinn þess, þá einungis að því er varðar þau ökutæki í flokki N1 eða N2 sem hafa hlutfall afls miðað við massa ökutækis sem er 44 W/kg eða minna, gildir eftirfarandi:

$$\text{Ef } \bar{v}_k \leq 74{,}6 \text{ km/h}$$

og

$$\left(v \cdot a_{pos}\right)_{k-}[95] > (0{,}136 \cdot \bar{v}_k + 14{,}44)$$

er uppfyllt er ferðin ómarktæk.

$$\text{Ef } \bar{v}_k > 74{,}6 \text{ km/h}$$

og

$$\left(v \cdot a_{pos}\right)_{k-}[95] > (-0{,}097 \cdot \bar{v}_k + 31{,}635)$$

er uppfyllt er ferðin ómarktæk.

Nota skal eftirfarandi gildi til að reikna út hlutfall afls miðað við massa:

— massinn sem samsvarar raunverulegum prófunarmassa ökutækisins, þ.m.t. ökumanni og PEMS-búnaði (kg),

— hæsta málafl hreyfils samkvæmt yfirlýsingu framleiðanda (W).“

f) Í stað liðar 4.1.2 kemur eftirfarandi:

„4.1.2. Sannprófun á RPA fyrir hvern hraðaflokk

Ef $\bar{v}_k \leq 94{,}05$ km/h og $RPA_k < (-0{,}0016 \cdot \bar{v}_k + 0{,}1755)$ er uppfyllt, er ferðin ómarktæk.

Ef $\bar{v}_k > 94{,}05$ km/h og $RPA_k < 0{,}025$ er uppfyllt, er ferðin ómarktæk.“

34) Ákvæðum 7. viðbætis b er breytt sem hér segir:

a) Í stað liðar 4.4.3 kemur eftirfarandi:

„4.4.3. Útreikningur á endanlegum niðurstöðum

Jákvæð uppsöfnuð aukning hæðar yfir sjávarmáli í heilli ferð skal reiknuð með því að heilda alla jákvæða innreiknaða og jafnaða veghalla, þ.e. $road_{grade,2}(d)$. Staðla skal niðurstöðuna með heildarprófunar-vegalengdinni dtot og setja fram í metrum af uppsafnaðri aukningu hæðar yfir sjávarmáli á hverja 100 kílómetra af vegalengdinni.

Jákvæð uppsöfnuð aukning hæðar yfir sjávarmáli í þéttbýlishluta ferðar skal þá reiknuð út frá hraða ökutækisins við hvern aðgreindan leiðarpunkt.

$$v_w = 1 / (t_{w,i} - t_{w,i-1}) \cdot 60^2 / 1\,000$$

Þar sem:

v_w - hraði ökutækis við leiðarpunkt [km/klst.]

Öll gagnamengi með v_w =< 60 km/klst. tilheyra þéttbýlishluta ferðarinnar.

Heilda alla jákvæða innreiknaða og jafnaða veghalla sem samsvara gagnamengjum úr þéttbýlishluta ferðar.

Heilda töluna á 1 m leiðarpunktum sem samsvara gagnamengjum úr þéttbýlishluta ferðar og deila með 1000 til að reikna út vegalengd prófunar í þéttbýli d_{urban} [km].

Jákvæð uppsöfnuð aukning hæðar yfir sjávarmáli í þéttbýlishluta ferðar skal þá reiknuð út með því að deila í hæðaraukningu í þéttbýli með vegalengd prófunar í þéttbýli og setja fram í metrum af uppsafnaðri aukningu hæðar yfir sjávarmáli á hverja 100 kílómetra af vegalengdinni.“

35) Ákvæði 7. viðbætis c falla brott.

36) Ákvæðum 8. viðbætis er breytt sem hér segir:

a) Í stað 1. og 2. liðar kemur eftirfarandi:

„1. INNGANGUR

Í þessum viðbæti er lýst kröfum er varða gagnaskipti milli mælikerfa og gagnamatshugbúnaðar og um skýrslugjöf og skipti á millibilsniðurstöðum og endanlegum niðurstöðum RDE-prófunar að gagnamati loknu.

Skipti á og skýrslugjöf um lögboðna og valkvæða mæliþætti skal samræmast kröfunum í lið 3.2 í 1. viðbæti. Tækniskýrslan samanstendur af 5 liðum:

i. gagnaskiptaskráin eins og lýst er í lið 4.1,

ii. skýrslugjafarskrá #1 eins og lýst er í lið 4.2.1,

iii. skýrslugjafarskrá #2 eins og lýst er í lið 4.2.2,

iv. lýsing á ökutæki og hreyfli eins og lýst er í lið 4.3,

v. myndræna stuðningsefnið fyrir uppsetningu á PEMS-kerfi eins og lýst er í lið 4.4.

2. TÁKN, MÆLIÞÆTTIR OG EININGAR

a_1	reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins
b_1	reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins
a_2	reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins
b_2	reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins
tol_{1-}	neðri frumvikmörk
tol_{1+}	efri frumvikmörk
$(v \cdot a_{pos})95_k$	95. hundraðshlutamark margfeldis raunhraða ökutækis og jákvæðrar hröðunar yfir 0,1 m/s^2 að teknu tilliti til þéttbýlis-, dreifbýlis- og hraðbrautarakstursins [m^2/s^3 eða W/kg]
RPA_k	hlutfallsleg jákvæð hröðun fyrir þéttbýlis-, dreifbýlis- og hraðbrautaraksturinn [m/s^2 eða kWs/(kg*km)]
IC_k	er hlutfall vegalengdar þar sem brunahreyfillinn er notaður í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$d_{ICE,k}$	er ekin vegalengd [km] með brunahreyfilinn í gangi í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$d_{EV,k}$	er ekin vegalengd [km] með brunahreyfilinn ekki í gangi í tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu, í allri RDE-ferðinni
$M_{CO_2,RDE,k}$	er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í allri RDE-ferðinni
$M_{CO_2,WLTP,k}$	er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í WLTP-prófuninni
$M_{CO_2,WLTP\_CS,k}$	er massi sértækrar koltvísýringslosunar [g/km] miðað við vegalengd sem á sér stað í WLTP-prófun í tengslum við tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu, sem prófað er í hleðsluham
r_k	hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist við RDE-prófunina og WLTP-prófunina
RF_k	er niðurstöðumatstuðullinn sem er reiknaður út fyrir RDE-ferðina

RF_{L1} er fyrsti mæliþáttur fallsins sem notað er til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn

RF_{L2} er annar mæliþáttur fallsins sem er notað til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn.“

b) Í stað liðar 3.1 kemur eftirfarandi:

„3.1. Almennt

Gefa skal skýrslu um losunargildi ásamt öðrum viðeigandi mæliþáttum og skiptast á þeim í formi gagnaskráa á csv-sniði. Gildi mæliþátta skulu aðskilin með kommu, ASCII-kóði #h2C. Gildi undirmæliþátta skulu aðskilin með tvípunkti, ASCII-kóði #h3B. Tugastafsmerki tölugilda skal vera punktur, ASCII-kóði #h2E. Í lok hverrar línu kemur vending og línuskipti, ASCII-kóði #h0D #h0A. Ekki skal nota nein tákn til að aðskilja þúsundir.“

c) Í stað liðar 3.3 kemur eftirfarandi:

„3.3. Millibilsniðurstöður og lokaniðurstöður

Samantekt á mæliþáttum millibilsniðurstaðna skal skrásett og hafa sömu uppsetningu og tilgreint er í töflu 3. Afla skal upplýsinganna í töflu 3 áður en gagnamatsaðferðunum og aðferðunum við útreikning á losun, sem mælt er fyrir um í 5. og 6. viðbæti, er beitt.

Ökutækjaframleiðandinn skal skrá fyrirliggjandi niðurstöður sem fengust með gagnamatsaðferðunum í aðskildar skrár. Skýrsla um niðurstöðurnar úr gagnamatinu sem var gert með aðferðinni sem er lýst í 5. viðbæti og með útreikningnum á losun sem lýst er í 6. viðbæti skal gefin í samræmi við töflur 4, 5 og 6. Inngangur skýrslugjafarskrárinnar skal vera í þremur hlutum. Fyrstu 95 línurnar skulu fráteknar fyrir sértækar upplýsingar um forsendur sem eru notaðar í gagnamatsaðferðinni. Í línum 101-195 skulu koma niðurstöðurnar úr gagnamatsaðferðinni. Línur 201-490 skulu fráteknar til skýrslugjafar um lokaniðurstöður um losun. Lína 501 og allar línur sem á eftir koma mynda meginmál skýrslugjafarskrárinnar og skulu innihalda nákvæmar niðurstöður úr gagnamatinu.“

d) Í stað liða 4.1 til 4.2.2. komi eftirfarandi:

„4.1. Gagnaskipti:

Vinstri dálkur töflu 1 er mæliþátturinn sem á að tilkynna (fast snið og efni). Miðdálkur töflu 1 er lýsingin og/eða einingin (fast snið og efni). Ef hægt er að lýsa mæliþætti með efnisatriði úr fyrir fram skilgreindri skrá úr miðdálkinum þá skal lýsa mæliþættinum með því fyrir fram skilgreinda flokkunarkerfi (t.d. í 19. línu gagnaskiptaskrárinnar ætti að lýsa ökutæki með handskiptingu sem handskiptu en ekki HS (e. *Mt*) eða handsk. (e. *Man*) eða út frá neinu öðru flokkunarkerfi). Færa ætti raunverulegu gögnin í hægri dálkinn í töflu 1. Dæmi um gögn hafa verið sett í töflurnar til að sýna réttu aðferðina við að fylla inn tilkynnta innihaldið. Uppröðunina á dálkum og línum (þ.m.t. eyður) verður að virða.

Tafla 1

Inngangur gagnaskiptaskrárinnar

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Dagsetning prófunar	[dd.mm.áááá]	13.10.2016
Stofnun sem hefur eftirlit með prófuninni	[heiti stofnunarinnar]	Dæmi
Staðsetning prófunar	[Borg (land)]	Ispra (Ítalía)
Stofnun sem óskar eftir prófuninni	[heiti stofnunarinnar]	Dæmi
Ökumaður ökutækisins	[TS/Lab/OEM]	VELA rannsóknarstofa
Gerð ökutækis	[verslunarheiti ökutækis]	Verslunarheiti
Framleiðandi ökutækisins	[heiti]	Dæmi

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Árgerð ökutækisins	[ár]	2017
Auðkenni ökutækisins	[verksmiðjunúmer ökutækis eins og skilgreint er í ISO 3779:2009]	ZA1JRC2U912345678
Staða kílómetramælis við upphaf prófunar	[km]	5 252
Staða kílómetramælis við lok prófunar	[km]	5 341
Ökutækjaflokkur	[flokkur eins og skilgreint er í II. viðauka við tilskipun 70/156/EBE]	M1
Losunarmörk fyrir gerðarviður-kenningu	[Euro X]	Euro 6c
Gerð kveikju	[r.kv. (PI), þj.kv. (CI)]	PI
Málafl hreyfils	[kW]	85
Toppgildi snúningsvægis	[Nm]	190
Slagrými hreyfils	[rúmsentimetrar]	1 197
Yfirfærsla	[Beinskipt, sjálfskipt eða samfelld, stiglaus skipting]	CVT
Fjöldi framgíra	[#]	6
Eldsneytistegund. Tilgreina eldsneytið sem notað er í prófuninni ef ökutæki notar fjölblöndueldsneyti	[bensín/dísilolía/fljótandi jarðolíugas/lífmetan/etanól/ lífdísilolía]	Dísilolía
Smurefni	[merking vöru]	5W30
Stærð fremri og aftari hjólbarða	[breidd.hæð.ummál felgu/breidd.hæð.ummál felgu]	195.55.20/195.55.20
Þrýstingur í hjólbörðum á fram- og afturási	[bar/bar]	2,5/2,6
Mæliþættir ökumótstöðu	[F_0/F_1/F_2]	60,1/0,704/0,03122
Prófunarlota vegna gerðarviður-kenningar	[NEDC/WLTC]	WLTC
Losun koltvísýrings við gerðarviður-kenningu	[g/km]	139,1
Losun koltvísýrings í lághraðaham WLTC-prófunarlotu	[g/km]	155,1
Losun koltvísýrings í miðlungs-hraðaham WLTC-prófunarlotu	[g/km]	124,5
Losun koltvísýrings í háhraðaham WLTC-prófunarlotu	[g/km]	133,8
Losun koltvísýrings í hæsta hraðaham WLTC-prófunarlotu	[g/km]	146,2
Prófunarmassi ökutækis ([1])	[kg]	1 743,1
Framleiðandi PEMS-kerfis	[heiti]	01. FRAML.
PEMS-gerð	[PEMS-verslunarheiti]	PEMS X56
PEMS-raðnúmer	[fjöldi]	C9658

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
PEMS-aflgjafi	[Gerð rafgeymis Li-ion/Ni-Fe/Mg-ion]	Li-ion
Framleiðandi greiningartækis fyrir lofttegundir	[heiti]	22. FRAML.
Gerð greiningartækis fyrir lofttegundir	[Gerð]	IR
Raðnúmer greiningartækis fyrir lofttegundir	[fjöldi]	556
Tegund knúningsafls	[Ökutæki með brunahreyfil/tvinnrafökutæki, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu/tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu	ICE
Rafhreyfilafl	[kW. 0 ef ökutæki hefur einungis brunahreyfil]	0
Ástand hreyfils við upphaf prófunar	[kaldur/heitur]	Kaldur
Drifhamur hjóla	[2WD/4WD]	2WD
Gervifarmþungi	[% fráviks frá farmþunga]	28
Eldsneyti sem er notað	[viðmiðun/markaður/EN228]	markaður
Mynsturdýpt hjólbarða	[mm]	5
Aldur ökutækis	[mánuðir]	26
Eldsneytisskömmtun	[Bein innsprautun/óbein innsprautun/ bein og óbein innsprautun]	Bein innsprautun
Gerð yfirbyggingar	[fernar dyr/hallbakur/skutbifreið/ tvennar dyr/ blæjubifreið/vöruflutningabifreið/sendibifreið]	fernar dyr
Koltvísýringslosun í hleðsluham (tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu)	[g/km]	—
Framleiðandi útblástursmassastreymismælis ([3])	[heiti]	EFMman 2
Gerð nema í útblástursmassa-streymismæli ([3])	[meginregla verkunarmáta]	Pitot
Raðnúmer útblástursmassa-streymismælis ([3])	[númer]	556
Með hverju útblástursmassastreymi er fundið	[útblástursmassastreymismælir/ stýrieining hreyfils/nemi]	útblástursmassastreymismælir
Loftþrýstingsnemi	[gerð/ framleiðandi]	Piezoresistor/AAA
Dagsetning prófunar	[dd.mm.áááá]	13.10.2016
Upphafstími forprófunarferlis	[klst:mín]	15:25
Upphafstími ferðar	[klst:mín]	15:42
Upphafstími eftirprófunarferlis	[klst:mín]	17:28
Endatími forprófunarferlis	[klst:mín]	15:32
Endatími ferðar	[klst:mín]	17:25
Endatími eftirprófunarferlis	[klst:mín]	17:38
Hármarkshitastig varmajafnvægis	[K]	291,2

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Lágmarkshitastig varmajafnvægis	[K]	290,7
Varmajafnvægi náð að öllu leyti eða að hluta til við rýmkuð skilyrði í umhverfishita	[já/nei]	Nei
Drifhamur ökutækis með brunahreyfil ef við á	[venjulegur/kappakstur/vistvænn]	Vistvænn
Drifhamur tengitvinnrafökutækis	[hleðsluhamur/afhleðsluhamur/hleðsla rafgeymis/væg notkun]	
Einhver virk öryggiskerfi gerð óvirk við prófunina?	[Nei/ESP/ABS/AEB]	Nei
Stöðvunar-/ræsingarkerfi virkt	[Já/nei/ekkert SS]	Ekkert SS
Loftræsting	[af/á]	af
Tímaleiðrétting: THC-hliðrun	[s]	
Tímaleiðrétting: CH4-hliðrun	[s]	
Tímaleiðrétting: NMHC-hliðrun	[s]	
Tímaleiðrétting: Hliðrun súrefnis	[s]	–2
Tímaleiðrétting: PN-hliðrun	[s]	3,1
Tímaleiðrétting: CO-hliðrun	[s]	2,1
Tímaleiðrétting: CO_2-hliðrun	[s]	2,1
Tímaleiðrétting: NO-hliðrun	[s]	–1,1
Tímaleiðrétting: NO_2-hliðrun	[s]	–1,1
Tímaleiðrétting: Hliðrun útblásturs-massastreymis	[s]	3,2
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir THC	[ppm]	
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir CH4	[ppm]	
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir NMHC	[ppm]	
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir O_2	[%]	
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir PN	[#]	
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir CO	[ppm]	18 000
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir CO_2	[%]	15
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir NO	[ppm]	4 000
Viðmiðunargildi mælisviðs fyrir NO_2	[ppm]	550
(4)		
(4)		
(4)		

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
(4)		
(4)		
(4)		
Núllsvörun fyrir prófun THC	[ppm]	
Núllsvörun fyrir prófun CH_4	[ppm]	
Núllsvörun fyrir prófun NMHC	[ppm]	
Núllsvörun fyrir prófun O_2	[%]	
Núllsvörun fyrir prófun PN	[#]	
Núllsvörun fyrir prófun CO	[ppm]	0
Núllsvörun fyrir prófun CO_2	[%]	0
Núllsvörun fyrir prófun NO	[ppm]	0,03
Núllsvörun fyrir prófun NO_2	[ppm]	–0,06
Mælisviðssvörun fyrir prófun THC	[ppm]	
Mælisviðssvörun fyrir prófun CH_4	[ppm]	
Mælisviðssvörun fyrir prófun NMHC	[ppm]	
Mælisviðssvörun fyrir prófun O_2	[%]	
Mælisviðssvörun fyrir prófun PN	[#]	
Mælisviðssvörun fyrir prófun CO	[ppm]	18 008
Mælisviðssvörun fyrir prófun CO_2	[%]	14,8
Mælisviðssvörun fyrir prófun NO	[ppm]	4 000
Mælisviðssvörun fyrir prófun NO_2	[ppm]	549
Núllsvörun eftir prófun THC	[ppm]	
Núllsvörun eftir prófun CH_4	[ppm]	
Núllsvörun eftir prófun NMHC	[ppm]	
Núllsvörun eftir prófun O_2	[%]	
Núllsvörun eftir prófun PN	[#]	
Núllsvörun eftir prófun CO	[ppm]	0
Núllsvörun eftir prófun CO_2	[%]	0

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Núllsvörun eftir prófun NO	[ppm]	0,11
Núllsvörun eftir prófun NO_2	[ppm]	0,12
Mælisviðssvörun eftir prófun THC	[ppm]	
Mælisviðssvörun eftir prófun CH_4	[ppm]	
Mælisviðssvörun eftir prófun NMHC	[ppm]	
Mælisviðssvörun eftir prófun O_2	[%]	
Mælisviðssvörun eftir prófun PN	[#]	
Mælisviðssvörun eftir prófun CO	[ppm]	18 010
Mælisviðssvörun eftir prófun CO_2	[%]	14,55
Mælisviðssvörun eftir prófun NO	[ppm]	4 505
Mælisviðssvörun eftir prófun NO_2	[ppm]	544
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir THC	[mg/km]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CH_4	[mg/km]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NMHC	[mg/km]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir PN	[#/km]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CO	[mg/km]	56,0
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CO_2	[g/km]	2,2
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO_X	[mg/km]	11,5
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir THC	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CH_4	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NMHC	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir PN	[% af agnamælingakerfinu]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CO	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	2,0
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir CO_2	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	3,5
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO_X	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	4,2
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO	[mg/km]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO_2	[mg/km]	

AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	
PEMS-fullgilding — niðurstöður fyrir NO_2	[% af rannsóknarstofuviðmiðuninni]	
Vikmörk NO_X	[gildi]	0,43
Vikmörk fjölda efnisagna	[gildi]	0,5
Vikmörk CO	[gildi]	
K_i notað	[enginn/viðbætinn/margfaldandi]	Ekkert
K_i stuðull/ Ki fráviksgildi	[gildi]	
([5])		

([1]) Massi ökutækis eins og hann var í prófun á vegi, þ.m.t. massi ökumanns og allra íhluta PEMS-kerfisins, þ.m.t. allur tilbúinn gervifarmþungi.
([2]) Frátekið fyrir viðbótarupplýsingar um framleiðendur greiningartækja og raðnúmer ef fleiri en eitt greiningartæki er notað.
([3]) Lögboðið ef útblástursmassastreymið er ákvarðað með útblástursmassastreymismæli.
([4]) Ef þörf er á má færa inn viðbótarupplýsingar hérna.
([5]) Viðbótarmæliþáttum má bæta við til að auðkenna og merkja prófunina.

Meginmál gagnaskiptaskrárinnar samanstendur af þriggja línu yfirskrift sem samsvarar línum 198, 199 og 200 (tafla 2, víxlað) og raunverulegum gildum sem skráð eru í ferðinni, sem hafa á með frá línu 201 og þar til greint hefur verið frá öllum gögnum. Vinstri dálkur töflu 2 samsvarar línu 198 í gagnaskiptaskránni (fast snið). Miðdálkur töflu 2 samsvarar línu 199 í gagnaskiptaskránni (fast snið). Hægri dálkur töflu 2 samsvarar línu 200 í gagnaskiptaskránni (fast snið).

Tafla 2

Meginmál gagnaskiptaskrárinnar; línunum og dálkunum í þessari töflu skal víxlað í meginmáli gagnaskiptaskrárinnar

Tími	ferð	[s]
Hraði ökutækis ([1])	Nemi	[km/klst.]
Hraði ökutækis ([1])	GPS-staðsetningarkerfi	[km/klst.]
Hraði ökutækis ([1])	ECU	[km/klst.]
Breiddargráða	GPS-staðsetningarkerfi	[gráða:mín:s]
Lengdargráða	GPS-staðsetningarkerfi	[gráða:mín:s]
Hæð yfir sjávarmáli ([1])	GPS-staðsetningarkerfi	[m]
Hæð yfir sjávarmáli ([1])	Nemi	[m]
Loftþrýstingur	Nemi	[kPa]
Umhverfishiti	Nemi	[K]
Umhverfisraki	Nemi	[g/kg]
THC-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
CH_4-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
NMHC-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
CO-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
CO_2-styrkur	Greiningartæki	[ppm]

NO_X-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
NO-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
NO_2-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
O_2-styrkur	Greiningartæki	[ppm]
Agnaþéttni	Greiningartæki	[#/m^3]
Útblástursmassastreymi	útblástursmassastreymismælir	[kg/s]
Hitastig útblásturslofts í útblástursmassastreymismælinum (EFM)	útblástursmassastreymismælir	[K]
Útblástursmassastreymi	Nemi	[kg/s]
Útblástursmassastreymi	ECU	[kg/s]
THC-massi	Greiningartæki	[g/s]
CH_4-massi	Greiningartæki	[g/s]
NMHC-massi	Greiningartæki	[g/s]
CO-massi	Greiningartæki	[g/s]
CO_2-massi	Greiningartæki	[g/s]
NO_X-massi	Greiningartæki	[g/s]
NO-massi	Greiningartæki	[g/s]
NO_2-massi	Greiningartæki	[g/s]
Súrefnismassi	Greiningartæki	[g/s]
PN	Greiningartæki	[#/s]
Mæling lofttegunda virk	PEMS	[virk (1); óvirk (0); villa (> 1)]
Snúningshraði hreyfils	ECU	[sn./mín.]
snúningsvægi hreyfils	ECU	[Nm]
Snúningsvægi við drifás	Nemi	[Nm]
Snúningshraði hjóla	Nemi	[rad/s]
Eldsneytisstreymi	ECU	[g/s]
Eldsneytisstreymi til hreyfils	ECU	[g/s]
Inntaksloftstreymi til hreyfils	ECU	[g/s]
Hitastig kælivökva hreyfils	ECU	[K]
Hitastig á smurolíu	ECU	[K]
Endurnýjunarstaða	ECU	—
Staðsetning fetils	ECU	[%]
Staða ökutækis	ECU	[villa (1); eðlileg (0)]
Hundraðshlutfall snúningsvægis	ECU	[%]
Hundraðshlutfall núningsvægis	ECU	[%]

Hleðsluástand	ECU	[%]
Rakastig	Nemi	[%]
(2)		

(1) Skal ákvarða með minnst einni aðferð.
(2) Bæta má við viðbótarmæliþáttum til að auðkenna ökutækið og prófunarskilyrðin.

Vinstri dálkur töflu 3 er mæliþátturinn sem á að tilkynna (fast snið). Miðdálkur töflu 3 er lýsingin og/eða einingin (fast snið). Ef hægt er að lýsa mæliþætti með efnisatriði úr fyrir fram skilgreindri skrá úr miðdálkinum þá skal lýsa mæliþættinum með því fyrir fram skilgreinda flokkunarkerfi. Færa ætti raunverulegu gögnin í hægri dálkinn í töflu 3. Dæmi um gögn hafa verið sett í töfluna til að sýna réttu aðferðina við að fylla inn tilkynnta innihaldið. Uppröðunina á dálkum og línum verður að virða.

4.2. Millibilsniðurstöður og lokaniðurstöður

4.2.1. Millibilsniðurstöður

Tafla 3

Skýrslugjafarskrá #1 — Samantekt á mæliþáttum millibilsniðurstaðna

Heildarvegalengd ferðar	[km]	90,9
Heildartímalengd ferðar	[klst:mín:s]	01:37:03
Heildarstöðvunartími	[mín:s]	09:02
Meðalhraði í ferð	[km/klst.]	56,2
Hámarkshraði í ferð	[km/klst.]	142,8
Meðaltal THC-losunar	[ppm]	
Meðaltal CH4-losunar	[ppm]	
Meðaltal NMHC-losunar	[ppm]	
Meðaltal CO-losunar	[ppm]	15,6
Meðaltal CO_2-losunar	[ppm]	119 969,1
Meðaltal NO_X-losunar	[ppm]	6,3
Meðaltal fjölda losaðra agna	[#/m^3]	
Meðalútblástursmassastreymi	[kg/s]	0,010
Meðalhiti útblásturs	[K]	368,6
Hámarkshiti útblásturs	[K]	486,7
Uppsafnaður THC-massi	[g]	
Uppsafnaður CH_4-massi	[g]	
Uppsafnaður NMHC-massi	[g]	
Uppsafnaður CO-massi	[g]	0,69
Uppsafnaður CO_2-massi	[g]	12 029,53
Uppsafnaður NO_X-massi	[g]	0,71
Uppsafnaður agnafjöldi	[#]	
THC-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
CH_4-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
NMHC-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	

CO-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	7,68
CO_2-losun fyrir ferðina í heild	[g/km]	132,39
NO_X-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	7,98
Fjöldi losaðra agna fyrir ferðina í heild	[#/km]	
Vegalengd í þéttbýli	[km]	34,7
Tímalengd í þéttbýli	[klst:mín:s]	01:01:42
Stöðvunartími í þéttbýli	[mín:s]	09:02
Meðalhraði í þéttbýli	[km/klst.]	33,8
Hámarkshraði í þéttbýli	[km/klst.]	59,9
Meðalstyrkur THC við akstur í þéttbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur CH_4 við akstur í þéttbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur NMHC við akstur í þéttbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur CO við akstur í þéttbýli	[ppm]	23,8
Meðalstyrkur CO_2 við akstur í þéttbýli	[ppm]	115 968,4
Meðalstyrkur NO_X við akstur í þéttbýli	[ppm]	7,5
Meðalagnaþéttni við akstur í þéttbýli	[#/m^3]	
Meðalútblástursmassastreymi við akstur í þéttbýli	[kg/s]	0,007
Meðalhiti útblásturs við akstur í þéttbýli	[K]	348,6
Hámarkshiti útblásturs við akstur í þéttbýli	[K]	435,4
Uppsafnaður THC-massi við akstur í þéttbýli	[g]	
Uppsafnaður CH_4-massi við akstur í þéttbýli	[g]	
Uppsafnaður NMHC-massi við akstur í þéttbýli	[g]	
Uppsafnaður CO-massi við akstur í þéttbýli	[g]	0,64
Uppsafnaður CO_2-massi við akstur í þéttbýli	[g]	5 241,29
Uppsafnaður NO_X-massi við akstur í þéttbýli	[g]	0,45
Uppsafnaður agnafjöldi við akstur í þéttbýli	[#]	
THC-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
CH_4-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
NMHC-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
CO-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	18,54
CO_2-losun við akstur í þéttbýli	[g/km]	150,64
NO_X-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	13,18
Fjöldi losaðra agna við akstur í þéttbýli	[#/km]	
Vegalengd í dreifbýli	[km]	30,0
Tímalengd í dreifbýli	[klst:mín:s]	00:22:28
Stöðvunartími í dreifbýli	[mín:s]	00:00
Meðalhraði í dreifbýli	[km/klst.]	80,2

Hámarkshraði í dreifbýli	[km/klst.]	89,8
Meðalstyrkur THC við akstur í dreifbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur CH_4 við akstur í dreifbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur NMHC við akstur í dreifbýli	[ppm]	
Meðalstyrkur CO við akstur í dreifbýli	[ppm]	0,8
Meðalstyrkur CO_2 við akstur í dreifbýli	[ppm]	126 868,9
Meðalstyrkur NO_X við akstur í dreifbýli	[ppm]	4,8
Meðalagnaþéttni við akstur í dreifbýli	[#/m^3]	
Meðalútblástursmassastreymi í dreifbýli	[kg/s]	0,013
Meðalhiti útblásturs í dreifbýli	[K]	383,8
Hámarkshiti útblásturs í dreifbýli	[K]	450,2
Uppsafnaður THC-massi við akstur í dreifbýli	[g]	
Uppsafnaður CH_4-massi við akstur í dreifbýli	[g]	
Uppsafnaður NMHC-massi við akstur í dreifbýli	[g]	
Uppsafnaður CO-massi við akstur í dreifbýli	[g]	0,01
Uppsafnaður CO_2-massi við akstur í dreifbýli	[g]	3 500,77
Uppsafnaður NO_X-massi við akstur í dreifbýli	[g]	0,17
Uppsafnaður agnafjöldi við akstur í dreifbýli	[#]	
THC-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	
CH_4-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	
NMHC-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	
CO-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	0,25
CO_2-losun við akstur í dreifbýli	[g/km]	116,44
NO_X-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	5,78
Fjöldi losaðra agna við akstur í dreifbýli	[#/km]	
Vegalengd á hraðbraut	[km]	26,1
Tímalengd á hraðbraut	[klst:mín:s]	00:12:53
Stöðvunartími á hraðbraut	[mín:s]	00:00
Meðalhraði á hraðbraut	[km/klst.]	121,3
Hámarkshraði á hraðbraut	[km/klst.]	142,8
Meðalstyrkur THC við akstur á hraðbraut	[ppm]	

Meðalstyrkur CH_4 við akstur á hraðbraut	[ppm]	
Meðalstyrkur NMHC við akstur á hraðbraut	[ppm]	
Meðalstyrkur CO við akstur á hraðbraut	[ppm]	2,45
Meðalstyrkur CO_2 við akstur á hraðbraut	[ppm]	127 096,5
Meðalstyrkur NO_X við akstur á hraðbraut	[ppm]	2,48
Meðalagnaþéttni við akstur á hraðbraut	[#/m^3]	
Meðalútblástursmassastreymi á hraðbraut	[kg/s]	0,022
Meðalhiti útblásturs á hraðbraut	[K]	437,9
Hámarkshiti útblásturs á hraðbraut	[K]	486,7
Uppsafnaður THC-massi við akstur á hraðbraut	[g]	
Uppsafnaður CH_4-massi við akstur á hraðbraut	[g]	
Uppsafnaður NMHC-massi við akstur á hraðbraut	[g]	
Uppsafnaður CO-massi við akstur á hraðbraut	[g]	0,04
Uppsafnaður CO_2-massi við akstur á hraðbraut	[g]	3 287,47
Uppsafnaður NO_X-massi við akstur á hraðbraut	[g]	0,09
Uppsafnaður agnafjöldi við akstur á hraðbraut	[#]	
THC-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	
CH_4-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	
NMHC-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	
CO-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	1,76
CO_2-losun við akstur á hraðbraut	[g/km]	126,20
NO_X-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	3,29
Fjöldi losaðra agna við akstur á hraðbraut	[#/km]	
Hæð yfir sjávarmáli á byrjunarpunkti	(m yfir sjávarmáli)	123,0
Hæð yfir sjávarmáli á endapunkti	(m yfir sjávarmáli)	154,1
Uppsöfnuð hæðaraukning meðan á ferð stendur	[m/100 km]	834,1
Uppsöfnuð hæðaraukning í þéttbýli	[m/100 km]	760,9
Gagnamengi úr þéttbýlishluta ferðar með hröðunargildum > 0,1 m/s^2	[fjöldi]	845
$(v \cdot a_{pos})95$ urban	[m^2/s^3]	9,03
RPAurban	[m/s^2]	0,18

Gagnamengi úr dreifbýlishluta ferðar með hröðunargildum > 0,1 m/s^2	[fjöldi]	543
$(v \cdot a_{pos})95$ rural	[m^2/s^3]	9,60
RPArural	[m/s^2]	0,07
Gagnamengi úr hraðbrautarhluta ferðar með hröðunar-gildum > 0,1 m/s^2	[fjöldi]	268
$(v \cdot a_{pos})95$ motorway	[m^2/s^3]	5,32
RPAmotorway	[m/s^2]	0,03
Vegalengd kaldræsingar	[km]	2,3
Tímalengd kaldræsingar	[klst:mín:s]	00:05:00
Kaldræsing stöðvunartími	[mín:s]	60
Kaldræsing meðalhraði	[km/klst.]	28,5
Kaldræsing hámarkshraði	[km/klst.]	55,0
Ekin vegalengd í þéttbýli með brunahreyfil í gangi	[km]	34,8
Hraðamerki notað	[GPS/stýrieining hreyfils/nemi]	GPS-staðsetningarkerfi
T4253H-sía notuð	[já/nei]	nei
Tímalengd lengsta stöðvunartíma	[s]	54
stöðvun í þéttbýli > 10 sekúndur	[fjöldi]	12
Tímalengd í lausagangi eftir fyrstu ræsingu	[s]	7
Hraðahlutfall fyrir hraðbrautarhlutann > 145 km/klst.	[%]	0,1
Hámarkshæð yfir sjávarmáli í ferðinni	[m]	215
Hámarksumhverfishiti	[K]	293,2
Lágmarksumhverfishiti	[K]	285,7
Ferð farin að öllu leyti eða að hluta til við rýmkuð skilyrði um hæð yfir sjávarmáli	[já/nei]	nei
Ferð farin að öllu leyti eða að hluta til við rýmkuð skilyrði um umhverfishita	[já/nei]	nei
Meðaltal NO-losunar	[ppm]	3,2
Meðaltal NO_2-losunar	[ppm]	2,1
Uppsafnaður NO-massi	[g]	0,23
Uppsafnaður NO_2-massi	[g]	0,09
NO-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	5,90
NO_2-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	2,01
Meðalstyrkur NO við akstur í þéttbýli	[ppm]	7,6
Meðalstyrkur NO_2 við akstur í þéttbýli	[ppm]	1,2
Uppsafnaður NO-massi við akstur í þéttbýli	[g]	0,33
Uppsafnaður NO_2-massi við akstur í þéttbýli	[g]	0,12
NO-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	11,12
NO_2-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	2,12

Meðalstyrkur NO við akstur í dreifbýli	[ppm]	3,8
Meðalstyrkur NO_2 við akstur í dreifbýli	[ppm]	1,8
Uppsafnaður NO-massi við akstur í dreifbýli	[g]	0,33
Uppsafnaður NO_2-massi við akstur í dreifbýli	[g]	0,12
NO-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	11,12
NO_2-losun við akstur í dreifbýli	[mg/km]	2,12
Meðalstyrkur NO við akstur á hraðbraut	[ppm]	2,2
Meðalstyrkur NO_2 við akstur á hraðbraut	[ppm]	0,4
Uppsafnaður NO-massi við akstur á hraðbraut	[g]	0,33
Uppsafnaður NO_2-massi við akstur á hraðbraut	[g]	0,12
NO-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	11,12
NO_2-losun við akstur á hraðbraut	[mg/km]	2,21
AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Dagsetning prófunar	[dd.mm.áááá]	13.10.2016
Stofnun sem hefur eftirlit með prófuninni	[heiti stofnunarinnar]	Dæmi
([1])		

([1]) Bæta má við mæliþáttum til að auðkenna viðbótarþætti ferðar.

4.2.2. Niðurstöður úr gagnamatinu

Frá línu 1 til 497 í töflu 4 er vinstri dálkurinn sá mæliþáttur sem á að tilkynna (fast snið), miðdálkurinn er lýsingin og/eða einingin (fast snið) og hægri dálkurinn er þar sem færa ætti raunverulegu gögnin inn. Dæmi um gögn hafa verið sett í töfluna til að sýna réttu aðferðina við að fylla inn tilkynnta innihaldið. Uppröðunina á dálkum og línum verður að virða.

Tafla 4

Yfirskrift skýrslugjafarskráar #2 — Reiknistillingar í gagnamatsaðferð í samræmi við 5. og 6. viðbæti

Viðmiðunarmassi koltvísýrings	[g]	1 529,48
Reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins a_1	—	–1,99
Reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins b_1	—	238,07
Reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins a_2	—	0,49
Reiknistuðull einkennandi koltvísýringsferilsins b_2	—	97,02
[Frátekið til notkunar síðar]	—	
[Frátekið til notkunar síðar]	—	
[Frátekið til notkunar síðar]	—	

[Frátekið til notkunar síðar]	—	
[Frátekið til notkunar síðar]	—	
Reiknihugbúnaður og útgáfa hans	—	EMROAD V.5.90 B5
Efri frumvikmörk tol_{1+}	[%][% URB/ % RUR/ % MOT]	45/40/40
Neðri frumvikmörk tol_{1-}	[%]	25
IC(t)	[hlutfall brunahreyfils fyrir ferð í heild]	1
dICE(t)	[km með brunahreyfli fyrir ferð í heild]	88
dEV(t)	[km með rafafli fyrir ferð í heild]	0
mCO_2_WLTP_CS(t)	[kg koltvísýringslosunar sem á sér stað í WLTP-prófun á tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu sem prófað er í hleðsluham]	
MCO2_WLTP(t)	[sértæk koltvísýringslosun miðað við vegalengd, mæld í g/km, sem á sér stað í WLTP-prófun]	154
MCO2_WLTP_CS(t)	[sértæk koltvísýringslosun miðað við vegalengd, mæld í g/km, sem á sér stað í WLTP-prófun á tvinnrafökutæki ætluðu fyrir ytri hleðslu sem prófað er í hleðsluham]	
MCO2_RDE(t)	[massi sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd [g/km] í gegnum heila RDE-ferð]	122,4
MCO2_RDE(u)	[massi sértækrar koltvísýringslosunar miðað við vegalengd [g/km] í RDE-ferð í þéttbýli]	135,8
r(t)	[hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist við RDE-prófunina og WLTP-prófunina]	1,15
$r_{OVC-HEV}(t)$	[hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist við alla RDE-prófunina og alla WLTP-prófunina fyrir tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu]	
RF(t)	[niðurstöðumatstuðull sem er reiknaður út fyrir alla RDE-ferðina]	1
RFL1	[fyrsti mæliþáttur fallsins sem er notað til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn]	1,2
RFL2	[annar mæliþáttur fallsins sem er notað til að reikna út niðurstöðumatstuðulinn]	1,25
IC(u)	[hlutfall brunahreyfils í ferð í þéttbýli]	1
dICE(u)	[km með brunahreyfil í ferð í þéttbýli]	25
dEV(u)	[km með rafafli í ferð í þéttbýli]	0
r(u)	[hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist í RDE-prófun í þéttbýli og í fösum 1 + 2 í WLTP-prófuninni]	1,26

$r_{OVC\text{-}HEV}(u)$	[hlutfall milli koltvísýringslosunar sem mælist í þéttbýlishluta RDE-prófunarinnar og í allri WLTP-prófuninni fyrir tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu]	
RF(u)	[niðurstöðumatstuðull sem er reiknaður út fyrir RDE-ferðina í þéttbýli]	0,793651
AUÐKENNING PRÓFUNAR	[kóði]	TEST_01_Veh01
Dagsetning prófunar	[dd.mm.áááá]	13.10.2016
Stofnun sem hefur eftirlit með prófuninni	[heiti stofnunarinnar]	Dæmi
(1)		

(1) Bæta má við mæliþáttum fram að línu 95 til að auðkenna frekari reiknistillingar.

Upphaf töflu 5a er frá línu 101 í skýrslugjafarskrá #2 Vinstri dálkurinn er sá mæliþáttur sem á að tilkynna (fast snið), miðdálkurinn er lýsingin og/eða einingin (fast snið) og hægri dálkurinn er þar sem færa ætti raunverulegu gögnin inn. Dæmi um gögn hafa verið sett í töfluna til að sýna réttu aðferðina við að fylla inn tilkynnta innihaldið. Uppröðunina á dálkum og línum verður að virða.

Tafla 5a

Yfirskrift skýrslugjafarskráar #2 — Niðurstöður úr gagnamatsaðferð í samræmi við 5. viðbæti

Fjöldi glugga	—	4 265
Fjöldi þéttbýlisglugga	—	1 551
Fjöldi dreifbýlisglugga	—	1 803
Fjöldi hraðbrautarglugga	—	910
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
Fjöldi glugga innan tol_1	—	4 219
Fjöldi þéttbýlisglugga innan tol_1	—	1 535
Fjöldi dreifbýlisglugga innan tol_1	—	1 774
Fjöldi hraðbrautarglugga innan tol_1	—	910
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
Hlutdeild þéttbýlisglugga innan tol_1	[%]	99,0

Hlutdeild dreifbýlisglugga innan tol_1	[%]	98,4
Hlutdeild hraðbrautarglugga innan tol_1	[%]	100,0
Hlutdeild þéttbýlisglugga innan tol_1 sem er yfir 50%	[1 = Já, 0 = Nei]	1
Hlutdeild dreifbýlisglugga innan tol_1 sem er yfir 50%	[1 = Já, 0 = Nei]	1
Hlutdeild hraðbrautarglugga innan tol_1 sem er yfir 50%	[1 = Já, 0 = Nei]	1
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
([1])		

([1]) Viðbótarmæliþáttum má bæta við fram að línu 195.

Upphaf töflu 5b er frá línu 201 í skýrslugjafarskrá #2 Vinstri dálkurinn er sá mæliþáttur sem á að tilkynna (fast snið), miðdálkurinn er lýsingin og/eða einingin (fast snið) og hægri dálkurinn er þar sem færa ætti raunverulegu gögnin inn. Dæmi um gögn hafa verið sett í töfluna til að sýna réttu aðferðina við að fylla inn tilkynnta innihaldið. Upprööunina á dálkum og línum verður að virða.

Tafla 5b

Yfirskrift skýrslugjafarskráar #2 — Endanlegar losunarniðurstöður í samræmi við 6. viðbæti

THC-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
CH_4-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
NMHC-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
CO-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	
NO_X-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	6,73
Fjöldi losaðra agna fyrir ferðina í heild	[#/km]	$1,15 \times 10^{11}$
CO_2-losun fyrir ferðina í heild	[g/km]	
NO-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	4,73
NO_2-losun fyrir ferðina í heild	[mg/km]	2
THC-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
CH_4-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
NMHC-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
CO-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	
NO_X-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	8,13
Fjöldi losaðra agna við akstur í þéttbýli	[#/km]	$0,85 \times 10^{11}$
CO_2-losun við akstur í þéttbýli	[g/km]	
NO-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	6,41
NO_2-losun við akstur í þéttbýli	[mg/km]	2,5
(1)		

(1) Bæta má við viðbótarmæliþáttum.

Meginmál skýrslugjafarskráar #2 samanstendur af þriggja línu yfirskrift sem samsvara línum 498, 499 og 500 (tafla 6, víxlað) og raunverulegum gildum sem lýsa breytilegum meðaltalsgluggum, sem reiknaðir eru út í samræmi við 5. viðbæti, sem hafa skal með frá línu 501 og þar til greint hefur verið frá öllum gögnum. Vinstri dálkur töflu 6 samsvarar línu 498 í skýrslugjafarskrá #2 (fast snið). Miðdálkur töflu 6 samsvarar línu 499 í skýrslugjafarskrá #2 (fast snið). Hægri dálkur töflu 6 samsvarar línu 500 í gagnaskiptaskrá #2 (fast snið).

Tafla 6

Meginmál skýrslugjafarskráar #2 — Nákvæmar niðurstöður úr gagnamatsaðferð í samræmi við 5. viðbæti; línum og dálkum í þessari töflu skal víxlað í meginmáli skýrslugjafarskrárinnar

Upphafstími glugga		[s]
Endatími glugga		[s]

Tímalengd glugga		[s]
Vegalengd glugga	Uppruni (1 = GPS, 2 = stýrieining hreyfils, 3 = Nemi)	[km]
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
CO_2-losun í glugga		[g]
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
CO_2-losun í glugga		[g/km]
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
[Frátekið til notkunar síðar]	—	—
Fjarlægð glugga, h_j, frá einkennandi koltvísýringsferlinum		[%]
[Frátekið til notkunar síðar]		[-]
Meðalhraði ökutækis í glugga	Uppruni (1 = GPS, 2 = stýrieining hreyfils, 3 = Nemi)	[km/klst.]
(1)		

(1) Bæta má við viðbótarmæliþáttum til að auðkenna einkenni glugga.“

e) Eftirfarandi liður 4.4 bætist við:

„4.4. Myndrænt stuðningsefni fyrir uppsetningu PEMS-kerfis

Nauðsynlegt er að uppsetning PEMS-kerfis í hverju prófuðu ökutæki sé skjalfest með myndmiðlunarefni (ljósmyndir og/eða myndbönd). Myndirnar skulu vera nógu margar og hafa þannig gæði að dugi til að auðkenna ökutækið og til að meta hvort að uppsetning aðaleiningarinnar í PEMS-kerfinu, EFM-mælisins, loftnets GPS-kerfisins og veðurstöðvarinnar sé í samræmi við ráðleggingar frá framleiðendum mælitækjanna og almennar góðar starfsvenjur við PEMS-prófun.“

37) Í stað 9. viðbætis kemur eftirfarandi:

„9. viðbætir

Samræmisskírteini framleiðanda

Vottorð framleiðanda um að farið sé að kröfum um losun í raunverulegum akstri

(Framleiðandi): .....

(Heimilisfang framleiðanda): .....

Vottar hér með að

Þær gerðir ökutækja sem eru skráðar í viðhenginu við þetta vottorð uppfylla þær kröfur sem mælt er fyrir um í lið 2.1 í III. viðauka A við reglugerð (ESB) nr. 2017/1151 er varða losun í raunverulegum akstri fyrir allar mögulegar prófanir á losun í raunverulegum akstri, sem eru í samræmi við kröfurnar í þessum viðauka.

Gjört í [..... (Staður)]

Hinn [..... (Dagsetning)]

.....

(Stimpill og undirskrift fulltrúa framleiðanda)

Viðauki:

— Skrá yfir gerðir ökutækja sem þetta vottorð nær til

— Skrá yfir uppgefin hámarksgildi fyrir losun í raunverulegum akstri fyrir hverja gerð ökutækis, gefin upp sem mg/km eða fjöldi agna/km, eins og við á, án þess að notuð séu vikmörkin sem tilgreind eru í lið 2.1.1 í III. viðauka A.“

———

IV. VIÐAUKI

„VI. VIÐAUKI

ÁKVÖRÐUN LOSUNAR VIÐ UPPGUFUN

(PRÓFUN 4)

1. **Inngangur**

Í þessum viðauka er kveðið á um aðferðina til að ákvarða magn losunar við uppgufun frá léttum ökutækjum með endurtakanlegum og samanburðarnákvæmum hætti sem er ætlað að vera dæmigerður fyrir raunverulega notkun ökutækis.

2. **Frátekið til notkunar síðar**

3. **Skilgreiningar**

Í þessum viðauka er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

3.1. Prófunarbúnaður

3.1.1. „*Nákvæmni*“: munurinn á mæligildi og viðmiðunargildi sem hægt er að rekja til landsstaðals og sem er lýsandi fyrir réttleika niðurstöðu.

3.1.2. „*Kvörðun*“: ferli sem miðar að því að stilla svörun mælikerfis þannig að úttak þess samræmist ýmsum viðmiðunarmerkjum.

3.2. Tvinnrafökutæki

3.2.1. „*Rekstrarskilyrði í afhleðsluham*“ (e. *charge-depleting operating condition*): rekstrarskilyrði þar sem orkan, sem geymd er í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu, kann að sveiflast en minnkar að meðaltali meðan að ökutækinu er ekið fram að umbreytingu yfir í hleðsluham.

3.2.2. „*Rekstrarskilyrði í hleðsluham*“ (e. *charge-sustaining operating condition*): rekstrarskilyrði þar sem orkan, sem geymd er í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu, kann að sveiflast en er að meðaltali viðhaldið í hlutlausu hleðslujafnvægi meðan að ökutækinu er ekið.

3.2.3. „*Tvinnrafökutæki, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu*“ (*NOVC-HEV*): tvinnrafökutæki sem ekki er hægt að hlaða með ytri raforkugjafa.

3.2.4. „*Tvinnrafökutæki, ætlað fyrir ytri hleðslu*“ (*OVC-HEV*): tvinnrafökutæki sem hægt er að hlaða með ytri raforkugjafa.

3.2.5. „*Tvinnrafökutæki*“ (e. *hybrid electric vehicle, HEV*): tvinnökutæki þar sem annar orkubreytirinn fyrir knúningsorku er rafvél.

3.2.6. „*Tvinnökutæki*“ (e. *hybrid vehicle, HV*): ökutæki búið aflrás sem hefur a.m.k. tvo ólíka flokka orkubreyta fyrir knúningsorku og a.m.k. tvo ólíka flokka geymslukerfa fyrir knúningsorku.

3.3. Losun við uppgufun

3.3.1. „*Eldsneytisgeymiskerfi*“: búnaður sem gerir kleift að geyma eldsneyti og sem samanstendur af eldsneytisgeyminum, eldsneytisáfyllingarstútnum, lokinu á eldsneytisgeyminum og eldsneytisdælunni þegar hún er sett upp í eða á eldsneytisgeyminum.

3.3.2. „*Eldsneytiskerfi*“: íhlutir sem geyma eða flytja eldsneyti um borð í ökutækinu og sem samanstanda af eldsneytisgeymiskerfinu, öllum leiðslum fyrir eldsneyti og gufu, þeim eldsneytisdælum sem ekki eru festar á eldsneytisgeymi og hylki með virku kolefni.

3.3.3. „*Vinnslugeta bútans*“ (*BWC*): massinn af bútani sem hylki getur frásogað.

3.3.4. „*BWC300*“: vinnslugeta bútans eftir öldrun eldsneytis í gegnum 300 lotur.

3.3.5. „*Gegndræpistuðull*“ (*PF*): stuðull sem er ákvarðaður út frá tapi vetniskolefna á ákveðnu tímabili og er notaður til að ákvarða heildarlosun við uppgufun.

3.3.6. „*Einlaga geymir, ekki úr málmi*“: eldsneytisgeymir gerður úr einu lagi af málmlausu efni, þ.m.t. flúoruð/súlfónuð efni.

3.3.7. „*Marglaga geymir*“: eldsneytisgeymir gerður úr a.m.k. tveimur mismunandi lagskiptum efnum þar sem annað þeirra er tálmi gegn vetniskolefnum.

3.3.8. „*Þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi*“: eldsneytisgeymiskerfi þar sem ekki er útstreymi á eldsneytisgufum í kyrrstöðu í þeirri 24 klukkustunda sólarhringslotu sem skilgreind er í 2. viðbæti 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 þegar notað er viðmiðunareldsneyti sem skilgreint er í þætti A.1 í IX. viðauka við þessa reglugerð.

3.3.9. „*Losun við uppgufun*“: í tengslum við þessa reglugerð eru þetta gufur vetniskolefna sem tapast úr eldsneytiskerfi vélknúins ökutækis í kyrrstöðu og strax fyrir eldsneytisáfyllingu þéttlokaðs eldsneytisgeymis.

3.3.10. „*Eineldsneytisökutæki, knúið gasi*“ (e. *mono-fuel gas vehicle*): eineldsneytisökutæki sem er knúið einni eldsneytistegund og gengur fyrst og fremst fyrir fljótandi jarðolíugasi, jarðgasi/lífmetani eða vetni en getur einnig haft bensínkerfi til að nota í neyðartilvikum eða eingöngu til að ræsa ökutækið og bensíngeymirinn tekur ekki meira en 15 lítra af bensíni.

3.3.11. „*Blásturstap af völdum þrýstingsfalls*“: loftun vetniskolefna við þrýstingslosun úr þéttlokuðu eldsneytisgeymiskerfi, eingöngu gegnum geymslueininguna fyrir gufur sem er hluti af kerfinu.

3.3.12. „*Tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall*": þau vetniskolefni sem streyma í gegnum geymslueininguna fyrir gufur vegna blásturstaps af völdum þrýstingsfalls.

3.3.13. „*Þrýstingslosun í eldsneytisgeymi*“: lágmark þrýstingsgildisins þar sem þéttlokaða eldsneytisgeymiskerfið byrjar loftun einungis sem viðbragð við þrýstingi inni í geyminum.

3.3.14. „*Viðbótarhylki*“: hylki sem er notað til að mæla tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall.

3.3.15. „*2 g mettunarpunktur*“: skal teljast vera náð þegar uppsafnaður styrkur losaðra vetniskolefna úr hylkinu með virku kolefni samsvarar 2 grömmum.

4. **Skammstafanir**

Almennar skammstafanir

BWC	Vinnslugeta bútans
PF	Gegndræpistuðull
APF	Fyrirframákveðinn gegndræpistuðull
OVC-HEV	Tvinnrafökutæki sem er ætlað fyrir ytri hleðslu
NOVC-HEV	Tvinnrafökutæki sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu
WLTC	Prófunarlota fyrir létt ökutæki á heimsvísu
REESS	Endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi

5. **Almennar kröfur**

5.1. Ökutækið og þeir íhlutir þess sem geta haft áhrif á losun við uppgufun skulu þannig hönnuð, smíðuð og samsett að ökutækið geti, við venjulega notkun og við venjuleg notkunarskilyrði eins og raka, rigningu, snjó, hita, kulda, sand, óhreinindi, titring, slit o.s.frv., uppfyllt ákvæði þessarar reglugerðar á endingartíma þeirra.

5.1.1. Í þessu skal felast að hosur, samskeyti og tengingar, sem notuð eru í mengunarvarnarkerfinu fyrir uppgufun, séu örugg.

5.1.2. Hvað ökutæki með þéttlokuðu eldsneytisgeymiskerfi varðar skal þetta einnig fela í sér að til staðar sé kerfi sem losar þrýsting í geyminum, rétt fyrir eldsneytisáfyllingu, einungis gegnum geymslueiningu fyrir gufur sem er einungis notuð til að geyma eldsneytisgufur. Þessi leið loftunar skal einnig vera sú eina sem er notuð ef þrýstingurinn í geyminum fer yfir öruggan vinnuþrýsting hans.

5.2. Velja skal prófunarökutækið í samræmi við lið 5.5.2.

5.3. Prófunarskilyrði fyrir ökutæki

5.3.1. Gerðir og magn smurefna og kælivökva fyrir losunarprófun skulu vera eins og framleiðandi tilgreinir fyrir eðlilega notkun ökutækis.

5.3.2. Eldsneytistegund fyrir prófun skal vera eins og tilgreint er þætti A.1 í IX. viðauka.

5.3.3. Öll mengunarvarnarkerfi fyrir uppgufun skulu vera í nothæfu ástandi.

5.3.4. Notkun temprunarbúnaðar er bönnuð í samræmi við ákvæði 2. mgr. 5. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007.

5.4. Ákvæði um öryggi rafeindakerfisins

5.4.1. Ákvæði um öryggi rafeindakerfisins skulu vera þau sem tilgreind eru í lið 2.3 í I. viðauka.

5.5. Uppgufunarlosunarhópur

5.5.1. Einungis ökutæki sem eru eins að því er varðar þá eiginleika sem taldir eru upp í a-, c- og d-lið, tæknilega jafngild að því er varðar eiginleikana í b-lið eða álíka eiginleika eða, eftir atvikum, sem eru innan tilgreindra vikmarka varðandi eiginleikana í e- og f-lið mega vera í sama uppgufunarlosunarhóp:

a) Smíðaefni og smíði eldsneytisgeymiskerfis,

b) smíðaefni gufuslöngu, eldsneytisleiðslu og aðferð við tengingu,

c) þéttlokað eldsneytisgeymslukerfi eða eldsneytisgeymslukerfi sem er ekki þéttlokað,

d) stillingu öryggisloka eldsneytisgeymis (inntaka og losun lofts),

e) vinnslugetu bútans í hylkinu (BWC300) innan 10% sviðs frá hæsta gildinu (varðandi hylki sem innihalda sömu gerðina af viðarkolum skal magnið af viðarkolum vera innan 10% af því sem BWC300 hefur verið ákvarðað fyrir),

f) eftirlitskerfi fyrir hreinsun (t.d. gerð öryggisloka, eftirlitsaðferð fyrir hreinsun).

5.5.2. Ökutækið skal teljast gefa frá sér mestu hugsanlegu losun við uppgufun og skal notað við prófun ef það hefur hæsta hlutfallið á milli nafnrúmtaks eldsneytisgeymis og vinnslugetu bútans í hylkinu innan hópsins. Gera skal fyrirframsamkomulag við viðurkenningaryfirvaldið um val ökutækja.

5.5.3. Setja skal gerð ökutækisins í annan hóp ef notuð er ný kvörðun, stilling eða vélbúnaður í kerfi sem tengist mengunarvarnarkerfi fyrir uppgufun.

5.5.4. Auðkenni uppgufunarlosunarhóps

Úthluta skal öllum uppgufunarlosunarhópum sem skilgreindir eru í lið 5.5.1 sérstöku kennimerki með eftirfarandi sniði:

EV-nnnnnnnnnnnnnnn-WMI-x

Þar sem:

nnnnnnnnnnnnnnn er rittáknsstrengur með mest fimmtán rittáknum sem takmarkast við 0-9, A-Z og undirstrik „_“.

WMI (auðkenni framleiðanda á heimsvísu) er kóði sem auðkennir framleiðanda á einkvæman hátt sem er skilgreindur í ISO-staðli 3780:2009.

Fastsetja skal x við „1“ eða „0“ í samræmi við eftirfarandi ákvæði:

a) Í samkomulagi við viðurkenningaryfirvaldið og eiganda WMI-kóðans skal fastsetja númerið við „1“ ef ökutækjahópur er skilgreindur í þeim tilgangi að ná yfir ökutæki frá:

i) Stökum framleiðanda með einn stakan WMI-kóða,

ii) framleiðanda með nokkra WMI-kóða, en einungis í tilvikum þar sem nota á einn WMI-kóða,

iii) fleiri en einum framleiðanda, en einungis í tilvikum þar sem nota á einn WMI-kóða.

Ef um er að ræða það sem fram kemur í i., ii. og iii. lið skal auðkenniskóði hópsins samanstanda af einum einkvæmum streng með n-rittáknum og einum einkvæmum WMI-kóða og þar á eftir tölustafnum 1.

b) Í samkomulagi við viðurkenningaryfirvaldið skal númerið stillt á 0 ef ökutækjahópur er skilgreindur samkvæmt sömu viðmiðunum og samsvarandi ökutækjahópur sem skilgreindur er í samræmi við a-lið en framleiðandinn velur að nota annan WMI-kóða. Í því tilviki skal auðkenniskóði hópsins samanstanda af sama streng n-rittákna sem ákvarðaður er fyrir ökutækjahópinn sem skilgreindur er í samræmi við a-lið ásamt einkvæmum WMI-kóða sem skal vera ólíkur öllum þeim WMI-kóðum sem notaðir eru í tilviki a-liðar, og þar á eftir tölustafnum 0.

5.6. Viðurkenningaryfirvaldið skal ekki veita gerðarviðurkenningu ef upplýsingarnar sem lagðar eru fram eru ófullnægjandi til að unnt sé að sýna fram á að losun við uppgufun sé takmörkuð með skilvirkum hætti við venjulega notkun ökutækisins.

6. **Nothæfiskröfur**

6.1. Viðmiðunarmörk

Viðmiðunarmörkin skulu vera þau sem eru tilgreind í töflu 3 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007,

———

1. viðbætir

Aðferðir og skilyrði fyrir prófun 4

1. **Inngangur**

Í þessum viðauka er lýst verklaginu við prófun 4 þar sem losun ökutækja við uppgufun er ákvörðuð.

2. **Tæknilegar kröfur**

2.1. Aðferðin felur í sér prófun á losun við uppgufun og tvær viðbótarprófanir, eina á öldrun kolahylkis eins og lýst er í lið 5.1 í þessum viðbæti, og aðra á gegndræpi eldsneytisgeymiskerfisins, eins og lýst er í lið 5.2 í þessum viðbæti. Með prófuninni á losun við uppgufun (mynd VI.4) er unnt að ákvarða losun vetniskolefna við uppgufun af völdum sveiflna í hitastigi á sólarhring og á meðan heitvarmajafnvægi kemst á í kyrrstöðu.

2.2. Ef eldsneytiskerfið inniheldur fleiri en eitt kolahylki skulu allar tilvísanir í hugtakið „hylki“ í þessum viðauka gilda um sérhvert hylki.

3. **Ökutæki**

Ökutækið skal vera í góðu vélfræðilegu ásigkomulagi og hafa verið tilkeyrt a.m.k. 3000 km áður en prófunin hefst. Við ákvörðun á losun við uppgufun skal taka með ekna kílómetra og aldur ökutækisins sem er notað við vottunina í öllum viðeigandi prófunarskýrslum. Mengunarvarnarkerfið fyrir losun við uppgufun skal vera tengt og starfa rétt á tilkeyrslutímabilinu. Nota skal kolahylki sem hefur verið látið eldast samkvæmt aðferðinni sem tilgreind er í lið 5.1 í þessum viðbæti.

4. **Prófunarbúnaður**

4.1. Vegkefli

Vegkeflið skal uppfylla kröfurnar í 2. lið 5. undirviðauka við XXI. viðauka.

4.2. Prófunarklefi fyrir mælingu á losun við uppgufun

Prófunarklefi fyrir mælingu á losun við uppgufun skal uppfylla kröfurnar í lið 4.2 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

4.3. Greiningarkerfi

Greiningarkerfi skulu uppfylla kröfurnar í lið 4.3 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83. Ekki er skyldubundið að gera samfellda mælingu á vetniskolefnum nema notaður sé prófunarklefi fyrir fast rúmmál.

4.4. Kerfi fyrir skráningu hitastigs

Skráning hitastigs skal uppfylla kröfurnar í lið 4.5 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

4.5. Kerfi fyrir skráningu þrýstings

Skráning á þrýstingi skal uppfylla kröfurnar í lið 4.6 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, að undanskildu því að nákvæmni og upplausn skráningarkerfisins, sem skilgreindar eru í lið 4.6.2 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, skal vera:

a) Nákvæmni: ±0,3 kPa

b) Ályktun: 0,025 kPa

4.6. Viftur

Vifturnar skulu uppfylla kröfurnar í lið 4.7 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, að undanskildu því að afkastageta blásaranna skal vera 0,1 til 0,5 m^3/sek. í staðinn fyrir 0,1 til 0,5 m^3/mín.

4.7. Kvörðunarlofttegundir

Lofttegundirnar skulu uppfylla kröfurnar í lið 4.8 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

4.8. Viðbótarbúnaður

Viðbótarbúnaðurinn skal uppfylla kröfurnar í lið 4.9 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

4.9. Viðbótarhylki

Viðbótarhylkið ætti að vera eins og aðalhylkið en þarf ekki að hafa verið látið eldast. Tengileiðslan í hylki ökutækisins skal vera eins stutt og kostur er. Viðbótarhylkið skal vera að fullu hreinsað með þurru lofti áður en það er fyllt.

4.10. Vog fyrir vigtun hylkis

Vogin fyrir vigtun hylkis skal hafa ±0,02 g nákvæmni.

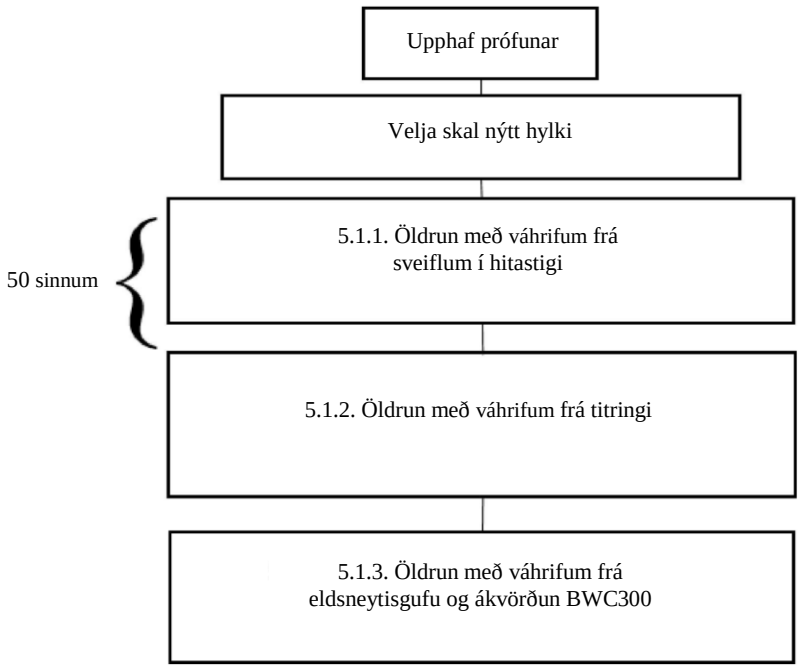
5. **Aðferð við öldrun hylkis í prófunarbekk og ákvörðun gegndræpistuðuls**

5.1. Öldrun hylkis í prófunarbekk

Áður en prófanir á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á (e. *hot soak*) og losun á sólarhring eru framkvæmdar skal hylkið látið eldast í samræmi við aðferðina sem lýst er á mynd VI.1.

Mynd VI.1

Aðferð við öldrun hylkis í prófunarbekk



5.1.1. Öldrun með váhrifum frá sveiflum í hitastigi

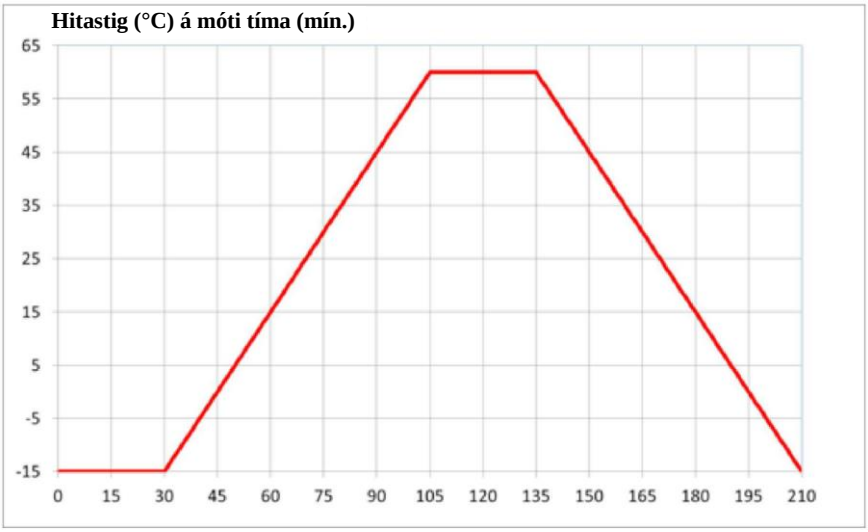
Skipta skal á milli hitastigs frá –15 °C til 60 °C í hylkinu í sérstökum prófunarklefa fyrir hitastig með 30 mínútum af stöðgun við –15 °C og 60 °C. Hver lota skal vara 210 mínútur (sjá mynd VI.2).

Hitaaukningin skal vera eins nálægt 1 °C/mín. og hægt er. Ekki ætti að þrýsta loftstreymi í gegnum hylkið.

Lotan skal endurtekin 50 sinnum í röð. Þessi aðferð varir í 175 klukkustundir samtals.

Mynd VI.2

Hitameðferðarlota



5.1.2. Öldrun með váhrifum frá titringi

Að lokinni öldrun með hita skal hylkið fest eins og það snýr í ökutækinu og hrist í lóðréttan ás með heildargildi Grms sem er > 1,5 m/sek^2 með tíðnina 30 ± 10 Hz. Prófunin skal vara í 12 klukkustundir.

5.1.3. Öldrun með váhrifum frá eldsneytisgufu og ákvörðun BWC300

5.1.3.1. Öldrunin skal fara fram með endurtekinni hleðslu með eldsneytisgufu og skolun með lofti úr rannsóknarstofu.

5.1.3.1.1. Eftir að hylkið er látið eldast út frá hitastigi og titringi skal það látið eldast enn frekar með blöndu af markaðseldsneyti eins og tilgreint er í lið 5.1.3.1.1.1 í þessum viðbæti og köfnunarefni eða lofti með 50 ± 15% af eldsneytisgufu. Halda skal áfyllingarhraða eldsneytisgufu á bilinu 60 ± 20 g/klst.

Hylkið skal hlaðið að 2 g mettunarpunkti. Í staðinn má hleðslu teljast vera lokið þegar vetniskolefnisstyrkurinn við úttak loftopsins nær 3000 milljónarhlutum.

5.1.3.1.1.1. Markaðseldsneytið, sem er notað í þessari prófun, skal uppfylla sömu kröfur og viðmiðunareldsneyti að því er varðar:

a) Eðlismassa við 15 °C,

b) gufuþrýsting,

c) eimingu (70 °C, 100 °C, 150 °C),

d) vetniskolefnisgreiningu (eingöngu ólefín, arómöt, bensen),

e) súrefnisinnihald,

f) etanólinnihald.

5.1.3.1.2. Hylkið skal hreinsað á bilinu frá 5 til 60 mínútum eftir hleðslu með 25 ± 5 lítrum af loftinu í rannsóknarstofunni á mínútu uns lofti kolahylkisins hefur verið skipt út 300 sinnum.

5.1.3.1.3. Endurtaka skal aðferðirnar sem settar eru fram í liðum 5.1.3.1.1 og 5.1.3.1.2 í þessum viðbæti 300 sinnum og að því loknu skal hylkið teljast vera stöðgað.

5.1.3.1.4. Aðferðin til að mæla vinnslugetu bútans (BWC) að því er tekur til uppgufunarlosunarhóps í lið 5.5. skal samanstanda af eftirfarandi:

a) Stöðgaða hylkið skal hlaðið að 2 g mettunarpunkti og síðan hreinsað að lágmarki 5 sinnum. Hleðslan skal framkvæmd með blöndu af 50% bútani og 50% köfnunarefni með massa miðað við rúmmál sem samsvarar 40 grömmum af bútani á klukkustund.

b) Framkvæma skal hreinsun í samræmi við lið 5.1.3.1.2 í þessum viðbæti.

c) Vinnslugeta bútans skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum eftir hverja hleðslu.

d) Reikna skal út BWC300 sem meðaltalið af síðustu 5 vinnslugetum bútans.

5.1.3.2. Ef birgir leggur fram hylki sem hefur verið látið eldast skal framleiðandinn tilkynna viðurkenningaryfirvaldinu fyrir fram um öldrunarferlið til að mögulegt sé að fylgjast með einhverjum hluta ferlisins á starfsstöð birgjans.

5.1.3.3. Framleiðandi skal afhenda viðurkenningaryfirvaldinu prófunarskýrslu sem inniheldur a.m.k. eftirfarandi þætti:

a) Gerð virks kolefnis,

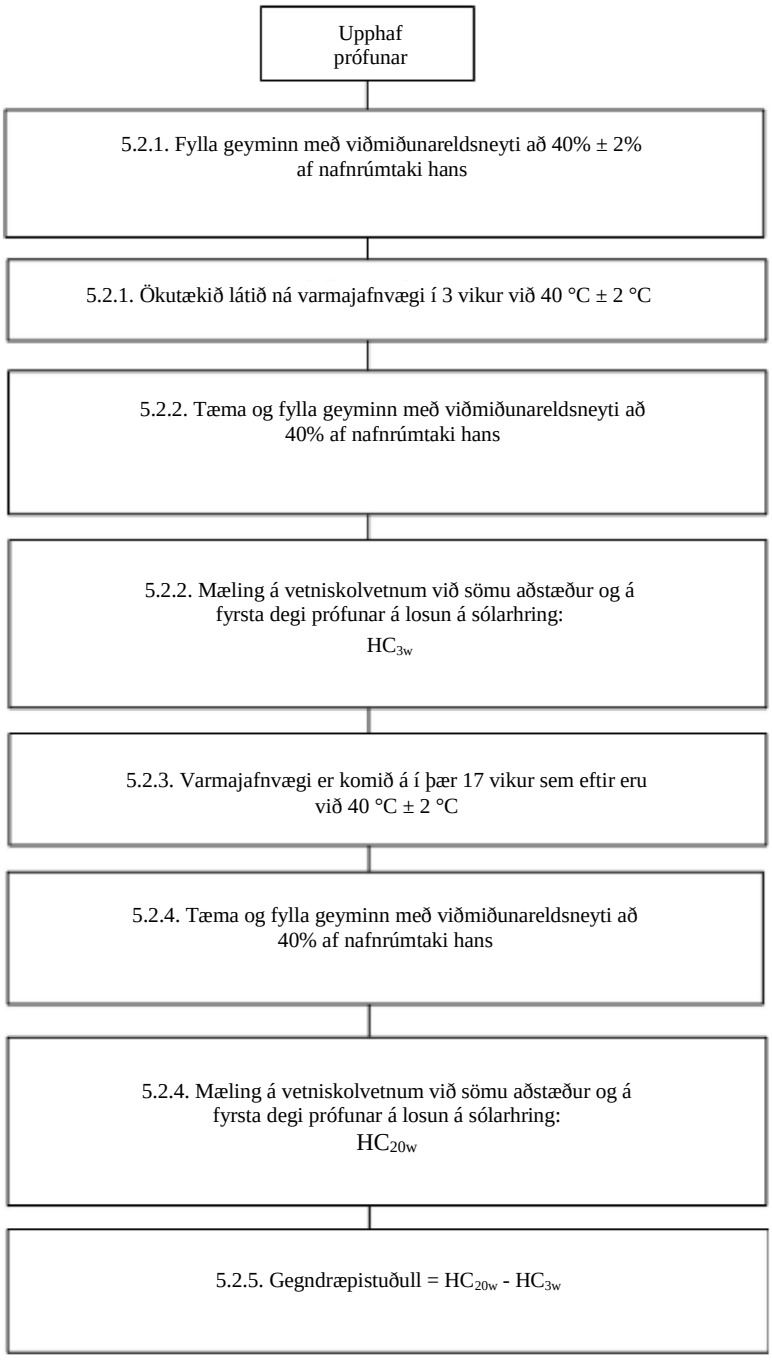
b) hleðsluhlutfall,

c) forskriftir fyrir eldsneyti.

5.2. Ákvörðun á gegndræpistuðli eldsneytisgeymslukerfisins (sjá mynd VI.3)

Mynd VI.3

Ákvörðun gegndræpistuðuls



5.2.1. Velja skal eldsneytisgeymiskerfi sem er dæmigert fyrir tiltekinn hóp og það kerfi skal fest á prófunarbekk þannig að það snýr á svipaðan hátt og það gerir um borð í ökutækinu. Eldsneytisgeymirinn skal fylltur að 40% ± 2% af nafnrúmtaki hans með viðmiðunareldsneyti við 18 °C ± 2 C° hitastig. Prófunarbekknum með eldsneytisgeymiskerfinu skal komið fyrir í herbergi með stýrðu hitastigi við 40 °C ± 2 °C í þrjár vikur.

5.2.2. Við lok þriðju viku skal geymirinn tæmdur og fylltur aftur með viðmiðunareldsneyti við 18 °C ± 2 °C að 40% ± 2% af nafnrúmtaki geymisins.

Innan 6 til 36 klukkustunda skal prófunarbekknum með eldsneytisgeymiskerfinu komið fyrir í klefa. Umhverfishitinn skal vera við 20 °C ± 2 °C á síðustu 6 klukkustundunum af þessu tímabili. Í klefanum skal sólarhringsprófunin gerð á fyrsta 24 klukkustunda tímabili aðferðarinnar sem lýst er í lið 6.5.9 í þessum viðbæti. Lofta skal eldsneytisgufunni út fyrir klefann til að útiloka þann möguleika að losunin, sem sleppur út við loftunina, teljist til gegndræpis. Mæla skal losun HC og gildið skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum sem HC_{3W}.

5.2.3. Prófunarbekknum með eldsneytisgeymiskerfinu skal aftur komið fyrir í herbergi með stýrðu hitastigi við 40 °C ± 2 °C í þær 17 vikur sem eftir eru.

5.2.4. Við lok sautjándu viku skal geymirinn tæmdur og fylltur aftur með viðmiðunareldsneyti við 18 °C ± 2 °C að 40% ± 2% af nafnrúmtaki geymisins.

Innan 6 til 36 klukkustunda skal prófunarbekknum með eldsneytisgeymiskerfinu komið fyrir í klefa. Umhverfishitinn skal vera við 20 °C ± 2 °C á síðustu 6 klukkustundunum af þessu tímabili. Í klefanum skal sólarhringsprófunin gerð á fyrsta 24 klukkustunda tímabili aðferðarinnar sem lýst er í samræmi við í lið 6.5.9 í þessum viðbæti. Lofta skal úr eldsneytisgeymiskerfinu út fyrir klefann til að útiloka þann möguleika að losunin, sem sleppur út við loftunina, teljist til gegndræpis. Mæla skal losun HC og gildið skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum í þessu tilviki sem HC_{20W}.

5.2.5. Gegndræpistuðullinn er mismunurinn á HC_{20W} og HC_{3W} í g/24 klst. sem er reiknað út með þriggja tölustafa nákvæmni með eftirfarandi jöfnu:

$$PF = HC_{20w} - HC_{3W}$$

5.2.6. Ef birgjar ákvarða gegndræpistuðulinn skulu framleiðendur upplýsa viðurkenningaryfirvaldið um það fyrir fram til að gera því kleift að vera viðstatt prófun í aðstöðu birgisins.

5.2.7. Framleiðandinn skal afhenda viðurkenningaryfirvaldinu prófunarskýrslu sem inniheldur a.m.k. eftirfarandi:

a) Ítarlega lýsingu á eldsneytisgeymiskerfinu sem er til prófunar, þ.m.t. upplýsingar um gerð geymisins sem er til prófunar, hvort geymirinn er úr málmi, einlaga eða marglaga málmlausu efni og hvaða efni eru notuð í geyminn og aðra hluta eldsneytisgeymiskerfisins,

b) vikulegan meðalhita sem öldrunin var framkvæmd við,

c) vetniskolefni sem mælast í viku 3 (HC_{3W}),

d) vetniskolefni sem mælast í viku 20 (HC_{20W}),

e) endanlegan gegndræpistuðul (PF).

5.2.8. Sem annan valkost við liði 5.2.1 til 5.2.7 í þessum viðbæti geta framleiðendur, sem nota marglaga geymi eða geymi úr málmi, valið að nota fyrirframákveðinn gegndræpistuðul í stað þess að framkvæma framangreindu ítarlegu mæliaðferðina:

Fyrirframákveðinn gegndræpistuðull fyrir marglaga tanka/tanka úr málmi = 120 mg/24 klst.

Kjósi framleiðandinn að nota fyrirframákveðinn gegndræpistuðul skal hann leggja fyrir viðurkenningaryfirvaldið yfirlýsingu þar sem gerð geymisins er greinilega tilgreind, auk yfirlýsingar um gerð efna sem notuð eru.

6. **Prófunaraðferð við mælingu á losun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á og vegna losunar á sólarhring**

6.1. Undirbúningur ökutækis

Ökutæki skulu undirbúin í samræmi við lið 5.1.1 og 5.1.2 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 Að beiðni framleiðanda og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins er heimilt að minnka bakgrunnslosun af öðrum toga en eldsneyti (t.d. málningu, límefni, plast, leiðslur fyrir eldsneyti og gufu, dekk og aðra íhlutir úr plasti eða fjölliðuefnum) áður en prófun fer fram (t.d. hitameðhöndlun dekkja við 50 °C eða hærri hita í viðeigandi tíma, hitameðhöndlun ökutækis, fjarlæging rúðuvökva).

Ef um er að ræða þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi skulu hylkin í ökutæki sett upp þannig að auðvelt sé að hafa aðgang að hylkjum og að tengja eða aftengja hylki.

6.2. Val á ham og forskriftir um gírskiptingar

6.2.1. Ef um er að ræða ökutæki með handskiptingu gilda lýsingarnar á gírskiptingu sem tilgreindar eru í 2. undirviðauka XXI. viðauka.

6.2.2. Ef um er að ræða hrein brunahreyfilsökutæki skal hamurinn valinn í samræmi við 6. undirviðauka XXI. viðauka.

6.2.3. Ef um er að ræða tvinnrafökutæki, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu skal hamurinn valinn í samræmi við 6. viðbæti við 8. undirviðauka XXI. viðauka.

6.2.4. Að beiðni viðurkenningaryfirvalds er heimilt að sá hamur sem er valinn sé annar en sá sem tilgreindur er í liðum 6.2.2 og 6.2.3 í þessum viðbæti.

6.3. Prófunarskilyrði

Þær prófanir sem taldar eru upp í þessum viðauka skulu framkvæmdar við prófunarskilyrði sem eiga sérstaklega við um brúunarhóp ökutækja H með hæstu orkuþörf í lotu af öllum þeim brúunarhópum sem falla undir sama uppgufunarlosunarhóp sem er til athugunar.

Óski viðurkenningaryfirvaldið þess er að öðrum kosti heimilt að við prófun sé notuð hvers konar orkuþörf fyrir lotu sem er dæmigerð fyrir ökutæki í hópnum.

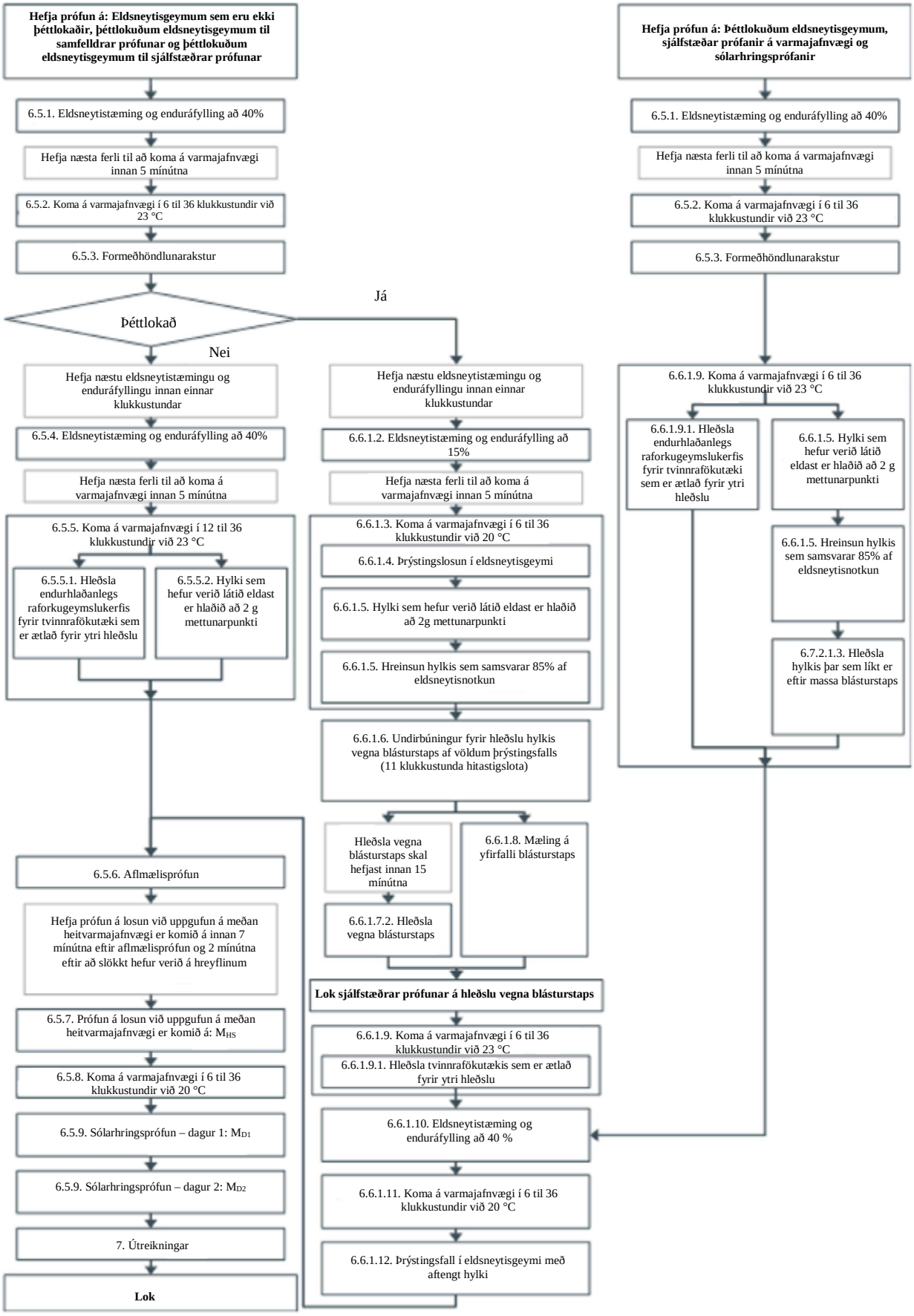
6.4. Flæði prófunaraðferðar

Fylgja skal prófunaraðferðinni fyrir þéttlokuð eldsneytisgeymslukerfi og eldsneytisgeymslukerfi sem eru ekki þéttlokuð í samræmi við flæðiritið á mynd VI.4.

Þéttlokuðu eldsneytisgeymiskerfin skulu vera prófuð samkvæmt einum af tveimur möguleikum. Einn valkostur er að prófa ökutækið með einni samfelldri prófunaraðferð. Annar valkostur, sem kallast sjálfstæða aðferðin, snýst um að prófa ökutækið með tveimur mismunandi aðferðum sem gera það kleift að endurtaka aflmælisprófunina og sólarhringsprófunina án þess endurtaka þurfi prófunina á tapi vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall í eldsneytisgeymi og mælinguna á blásturstapi af völdum þrýstingsfalls í eldsneytisgeymi.

Mynd VI.4

Flæðirit yfir prófunaraðferð



6.5. Samfelld prófunaraðferð fyrir eldsneytisgeymiskerfi sem eru ekki þéttlokuð

6.5.1. Eldsneytistæming og enduráfylling

Tæma skal eldsneytisgeymi ökutækisins. Þetta skal gert án þess að hreinsa eða fylla mengunarvarnakerfið fyrir uppgufun, sem er komið fyrir á ökutækinu, með óeðlilegum hætti. Yfirleitt nægir að fjarlægja eldsneytisgeymislokið í þessu skyni. Eldsneytisgeymirinn skal fylltur aftur með viðmiðunareldsneyti við 18 °C ± 2 °C að 40% ± 2% af nafnrúmtaki hans.

6.5.2. Varmajafnvægismeðhöndlun

Innan 5 mínútna frá því að eldsneytistæmingu og enduráfyllingu lýkur skal ökutækið látið ná varmajafnvægi í a.m.k. 6 klukkustundir og að hámarki í 36 klukkustundir við 23 °C ± 3 °C.

6.5.3. Formeðhöndlunarakstur

Setja skal ökutækið á vegkefli og keyra það í eftirfarandi fösum lotunnar sem lýst er í 1. undirviðauka XXI. viðauka:

a) Fyrir ökutæki í flokki 1: lág-, mið-, lág-, lág-, mið-, lág-.

b) Fyrir ökutæki í flokki 2 og 3: lág-, mið-, há-, mið-.

Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal formeðhöndlunaraksturinn fara fram við rekstrarskilyrði í hleðsluham eins og skilgreint er í lið 3.3.6 í XXI. viðauka. Nota má alla aðra hami, óski viðurkenningaryfirvaldið þess.

6.5.4. Eldsneytistæming og enduráfylling

Eldsneytisgeymir ökutækisins skal tæmdur innan einnar klukkustundar eftir formeðhöndlunaraksturinn. Þetta skal gert án þess að hreinsa eða fylla mengunarvarnakerfið fyrir uppgufun, sem er komið fyrir á ökutækinu, með óeðlilegum hætti. Yfirleitt nægir að fjarlægja eldsneytisgeymislokið í þessu skyni. Eldsneytisgeymirinn skal fylltur aftur með prófunareldsneyti við 18 °C ± 2 °C að 40% ± 2% af nafnrúmtaki hans.

6.5.5. Varmajafnvægismeðhöndlun

Innan fimm mínútna frá því að eldsneytistæmingu og enduráfyllingu lýkur skal ökutækið látið standa kyrrt í a.m.k. 12 klukkustundir og að hámarki í 36 klukkustundir við 23 °C ± 3 °C.

Meðan á varmajafnvægi er komið á má framkvæma aðferðirnar sem lýst er í liðum 6.5.5.1 og 6.5.5.2 annaðhvort í uppröðun með lið 6.5.5.1 fyrst og síðan lið 6.5.5.2 eða í uppröðun með lið 6.5.5.2 fyrst og síðan lið 6.5.5.1. Aðferðirnar sem lýst er í liðum 6.5.5.1 og 6.5.5.2 má einnig framkvæma samtímis.

6.5.5.1. Hleðsla endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis

Hvað varðar tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið hlaðið að fullu í samræmi við kröfurnar um hleðslu sem lýst er í lið 2.2.3 í 4. viðbæti við 8. undirviðauka XXI. viðauka.

6.5.5.2. Hleðsla hylkis

Hylkið, sem hefur verið látið eldast samkvæmt þeirri röð aðgerða sem er lýst í lið 5.1 í þessum viðbæti, skal hlaðið að 2 g mettunarpunkti í samræmi við aðferðina sem lýst er í lið 5.1.4 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

6.5.6. Aflmælisprófun

Ýta skal prófunarökutæki upp á vegkefli og keyra það í þeim fösum sem lýst er í a-lið eða b-lið liðar 6.5.3 í þessum viðbæti. Tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skulu keyrð við rekstrarskilyrði í afhleðsluham. Því næst skal slökkva á hreyflinum. Taka má sýni úr losun með útblæstri meðan á þessari aðgerð stendur og niðurstöðurnar má nota til gerðarviðurkenningar með tilliti til losunar með útblæstri og eldsneytisnotkunar ef þessi aðgerð uppfyllir kröfurnar sem lýst er í 6. eða 8. undirviðauka XXI. viðauka.

6.5.7. Prófun á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi er komið á

Innan sjö mínútna eftir aflmælisprófunina og innan 2 mínútna eftir að slökkt er á hreyflinum skal gera prófunina á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi er náð, í samræmi við lið 5.5 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83. Reikna skal út losunina á meðan heitvarmajafnvægi kemst á í samræmi við lið 7.1 í þessum viðbæti og hún skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum sem M_{HS}.

6.5.8. Varmajafnvægismeðhöndlun

Eftir prófunina á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á skal prófunarökutækið látið standa ekki skemur en 6 klukkustundir og ekki lengur en 36 klukkustundir eftir lok prófunar á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi er komið á og fyrir upphaf prófunar á losun á sólarhring. Í a.m.k. síðustu 6 klukkustundirnar á þessu tímabili skal ökutækið látið ná varmajafnvægi við 20 °C ± 2 °C.

6.5.9. Sólarhringsprófun

6.5.9.1. Prófunarökutækið skal látið verða fyrir tveimur lotum af umhverfishita samkvæmt því mynstri sem tilgreint er fyrir losunarprófunina á sólarhring í 2. viðbæti við 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 með ± 2 °C hámarksfráviki. Meðalfrávik á hitastigi frá mynstrinu, sem reiknað er út með notkun á algildi hvers mælds fráviks, skal ekki vera umfram ± 1 °C. Umhverfishiti skal mældur a.m.k. á hverri mínútu og hafður með á öllum viðeigandi prófunarblöðum. Hitastigslotur skulu hefjast á tíma $T_{start} = 0$ eins og tilgreint er í lið 6.5.9.6 í þessum viðbæti.

6.5.9.2. Lofta skal út úr klefanum í nokkrar mínútur strax áður en prófun fer fram, uns stöðugum aðstæðum er náð. Vifta eða viftur klefans skulu einnig vera í gangi á þessum tíma.

6.5.9.3. Flytja skal prófunarökutækið inn í klefann með slökkt á aflrásinni og glugga og farangursrými opin. Viftan eða vifturnar skulu stilltar þannig að hringrás lofts undir eldsneytisgeymi prófunarökutækis sé a.m.k. 8 km/klst.

6.5.9.4. Núllstilla skal og mælisviðskvarða vetniskolefnagreininn rétt áður en prófunin á sér stað.

6.5.9.5. Dyrum klefans skal lokað og þær loftþéttar.

6.5.9.6. Innan 10 mínútna frá lokun og loftþéttingu dyranna skal mæla styrk vetniskolefna, hitastig og loftþrýsting til að fá upphaflegar niðurstöður á styrk vetniskolefna í klefanum C_{HCi}, loftþrýsting P_i og umhverfishita í klefanum T_i fyrir sólarhringsprófunina. Á þeim punkti hefst $T_{start} = 0$.

6.5.9.7. Núllstilla skal og mælisviðskvarða vetniskolefnagreininn rétt áður en hverju sýnatökutímabili losaðra efna er lokið.

6.5.9.8. Lokin á fyrra og seinna sýnatökutímabili losaðra efna skulu eiga sér stað 24 klst. ± 6 mínútum og 48 klst. ± 6 mínútum, eftir því sem við á, frá því að fyrsta sýnataka hefst eins og tilgreint er í lið 6.5.9.6 í þessum viðbæti. Liðinn tími skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

Við lok hvers sýnatökutímabils losaðra efna skal mæla styrk vetniskolefna, hitastig og loftþrýsting og nota þá mælingu til að reikna út niðurstöður úr sólarhringsprófunum með jöfnunni í lið 7.1 í þessum viðbæti. Niðurstaðan sem fengin er úr fyrri 24 klukkustundunum skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum sem M_{D1}. Niðurstaðan sem fengin er úr seinni 24 klukkustundunum skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum sem M_{D2}.

6.6. Samfelld prófunaraðferð fyrir þéttlokuð eldsneytisgeymiskerfi

6.6.1. Ef þrýstingslosun í eldsneytisgeymi er meiri en eða jöfn 30 kPa.

6.6.1.1. Prófunin skal fara fram eins og lýst er í liðum 6.5.1 til 6.5.3 í þessum viðbæti.

6.6.1.2. Eldsneytistæming og enduráfylling

Eldsneytisgeymir ökutækisins skal tæmdur innan einnar klukkustundar eftir formeðhöndlunaraksturinn. Þetta skal gert án þess að hreinsa eða fylla mengunarvarnakerfið fyrir uppgufun, sem er komið fyrir á ökutækinu, með óeðlilegum hætti. Yfirleitt nægir að fjarlægja eldsneytisgeymislokið í þessu skyni, en annars skal aftengja hylkið. Eldsneytisgeymirinn skal fylltur aftur með viðmiðunareldsneyti við 18 °C ± 2 °C að 15% ± 2% af nafnrúmtaki geymisins.

6.6.1.3. Varmajafnvægismeðhöndlun

Innan 5 mínútna frá því að eldsneytistæmingu og enduráfyllingu lýkur skal ökutækið látið ná varmajafnvægi til stöðgunar í 6 til 36 klukkustundir við 20 °C ± 2 °C umhverfishita.

6.6.1.4. Þrýstingsfall í eldsneytisgeymi

Síðan skal losa þrýstinginn í eldsneytisgeyminum til að auka ekki þrýstinginn innan í eldsneytisgeyminum með óeðlilegum hætti. Þetta má gera með því að opna eldsneytisgeymislok ökutækisins. Óháð því hvaða aðferð er notuð við þrýstingsfall skal ökutækið fært aftur í upprunalegt ástand innan 1 mínútu.

6.6.1.5. Hleðsla og skolun hylkis

Hylkið, sem hefur verið látið eldast samkvæmt þeirri röð aðgerða sem er lýst í lið 5.1 í þessum viðbæti, skal hlaðið að 2 g mettunarpunkti í samræmi við aðferðina sem lýst er í lið 5.1.6 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 og síðan hreinsað með 25 ± 5 lítrum af loftinu í rannsóknarstofunni á mínútu. Rúmmál loftblásturs skal ekki vera umfram það magn sem ákvarðað er í lið 6.6.1.5.1. Þessa hleðslu og hreinsun skal framkvæma með a), hylki um borð í ökutækinu við 20 °C hita eða að öðrum kosti 23 °C hita eða b), með því að aftengja hylkið. Í báðum tilvikum er ekki heimilt að losa frekar um þrýsting í geyminum.

6.6.1.5.1. Ákvörðun á hámarksrúmmáli loftblásturs

Hámarksrúmmál loftblásturs $\mathrm{Vol}_{\mathrm{max}}$ skal ákvarða með eftirfarandi jöfnu. Ef um er að ræða tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skulu ökutækin notuð við rekstrarskilyrði í hleðsluham. Þessi ákvörðun má einnig fara fram í aðskilinni prófun eða meðan á formeðhöndlunarakstri stendur.

$$\text{Rúmmál}_{\text{max}} = \text{Rúmmál}_{\text{Pcycle}} \times \frac{\text{Rúmmál}_{\text{geymir}} \times 0{,}85 \times \frac{100}{\text{FC}_{\text{Pcycle}}}}{\text{Vegalengd}_{\text{Pcycle}}}$$

þar sem:

$\mathrm{Vol}_{\mathrm{Pcycle}}$ er uppsafnað rúmmál loftblásturs í lítrum, námundað að næsta 0,1 lítra, mælt með viðeigandi búnaði (t.d. streymismæli sem tengdur er við loftop kolahylkisins eða sambærilegum búnaði) meðan á formeðhöndlunarakstri úr kaldræsingu stendur, sem lýst er í lið 6.5.3 í þessum viðbæti,

$\mathrm{Vol}_{\mathrm{tank}}$ er nafnrúmtak eldsneytisgeymis framleiðandans í lítrum,

$\mathrm{FC}_{\mathrm{Pcycle}}$ er eldsneytisnotkunin í stöku hreinsunarlotunni sem lýst er í lið 6.5.3 í þessum viðbæti sem mæla má við heit- eða kaldræsingu, l/100 km. Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu skal eldsneytisnotkun reiknuð út í samræmi við lið 4.2.1 í 8. undirviðauka XXI. viðauka,

$\mathrm{Dist}_{\mathrm{Pcycle}}$ er fræðilega vegalengdin að næsta 0,1 km í einni hreinsunarlotu sem lýst er í lið 6.5.3 í þessum viðbæti, í km.

6.6.1.6. Undirbúningur á hleðslu í hylki vegna blásturstaps af völdum þrýstingsfalls

Eftir að hleðslu og skolun hylkis er lokið skal prófunarökutækið fært inn í prófunarklefa, annað hvort lokað rými til að ákvarða uppgufun (e. *SHED*) eða viðeigandi loftlagsklefa. Sýna skal fram á að kerfið leki ekki og að jafnþrýstingur fari fram með eðlilegum hætti meðan á prófuninni stendur eða með aðskilinni prófun (t.d. með þrýstiskynjara um borð í ökutækinu). Prófunarökutækið skal síðan látið verða fyrir fyrstu 11 klukkustundunum af því mynstri umhverfishita sem tilgreint er fyrir losunarprófunina á sólarhring í 2. viðbæti við 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, með ± 2 °C hámarksfráviki. Meðalfrávik á hitastigi frá mynstrinu, sem reiknað er út með notkun á algildi hvers mælds fráviks, skal ekki vera umfram ± 1 °C. Umhverfishitinn skal mældur a.m.k. á 10 mínútna fresti og hafður með á öllum viðeigandi prófunarblöðum.

6.6.1.7. Hleðsla í hylki vegna blásturstaps

6.6.1.7.1. Þrýstingsfall í eldsneytisgeymi á undan eldsneytisáfyllingu

Framleiðandinn skal tryggja að eldsneytisáfyllingin geti ekki hafist áður en að þrýstingsfallið í þéttlokaða eldsneytisgeymiskerfinu hefur að fullu náð þrýstingi sem er ekki meira en 2,5 kPa yfir loftþrýstingi við venjulegan rekstur og notkun ökutækis. Óski viðurkenningaryfirvaldið þess skal framleiðandinn leggja fram ítarlegar

upplýsingar eða sýna fram á að rekstur hafi farið fram (t.d. með þrýstiskynjara á ökutækinu). Leyfa má allar aðrar tæknilausnir að því tilskildu að tryggt sé að eldsneytisáfylling sé gerð með öruggum hætti og að engin umframlosun fari í andrúmsloftið áður en áfyllingarbúnaðurinn er tengdur við ökutækið.

6.6.1.7.2. Innan 15 mínútna frá því að umhverfishitinn hefur náð 35 °C skal öryggisloki geymisins opnaður til að hlaða hylkið. Framkvæma má þessa hleðslu annað hvort innan í eða fyrir utan klefa. Hylkið sem er hlaðið í samræmi við þennan lið skal aftengt og skal geymt á varmajafnvægissvæðinu. Setja skal upp gervihylki á ökutækinu við framkvæmd aðferðarinnar sem lýst er í liðum 6.6.1.9 til 6.6.1.12 í þessum viðbæti.

6.6.1.8. Mæling á tapi vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall

6.6.1.8.1. Mæla skal allt tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall úr hylki ökutækisins með því að nota viðbótarkolahylki sem tengt er beint við úttak geymslueiningar ökutækisins fyrir gufur. Það skal vigtað fyrir og eftir aðferðina sem lýst er í lið 6.6.1.7 í þessum viðbæti.

6.6.1.8.2. Að öðrum kosti er heimilt að nota lokað rými til að ákvarða uppgufun til að mæla tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall úr hylki ökutækisins meðan á þrýstingsfalli hylkisins stendur.

Innan 15 mínútna frá því að umhverfishiti hefur náð 35 °C eins og lýst er í lið 6.6.1.6 í þessum viðbæti skal klefanum lokað þétt og mæliaðferðin skal hefjast.

Vetniskolefnisgreinirinn skal núllstilltur og mælisviðskvarðaður og eftir það skal mæla styrk vetniskolefnis, hitastig og loftþrýsting til að fá upphaflegar niðurstöður C_{HCi}, P_i og T_i fyrir ákvörðunina á tapi vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall í þéttlokuðum geymi.

Umhverfishitinn T í klefanum skal ekki vera lægri en 25 °C meðan á mælingunni stendur.

Við lok aðferðarinnar sem lýst er í lið 6.6.1.7.2 í þessum viðbæti skal mæla styrk vetniskolefna í klefanum að 60 ± 5 sekúndum liðnum. Einnig skal mæla hita og loftþrýsting. Þetta eru endanlegar niðurstöður C_{HCf}, P_f and T_f fyrir tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall úr þéttlokuðum geymi.

Reikna skal út niðurstöðuna um tap vegna yfirfalls blásturs úr þéttlokuðum geymi í samræmi við lið 7.1 í þessum viðbæti og hún skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

6.6.1.8.3. Engin breyting skal hafa orðið á þyngd viðbótarhylkisins eða á niðurstöðu mælingarinnar í lokuðu rými til að ákvarða uppgufun, innan ±0,5 gramma vikmarka.

6.6.1.9. Varmajafnvægismeðhöndlun

Eftir að hleðslu vegna blásturstaps er lokið skal ökutækið látið ná varmajafnvægi í 6 til 36 klukkustundir við 23 °C ± 2 °C til að stöðga hitastig ökutækisins.

6.6.1.9.1. Hleðsla endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis

Hvað varðar tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skal endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið hlaðið að fullu í samræmi við kröfurnar um hleðslu sem lýst er í lið 2.2.3 í 4. viðbæti við 8. undirviðauka XXI. viðauka á meðan varmajafnvæginu er náð, sem lýst er í lið 6.6.1.9 í þessum viðbæti.

6.6.1.10. Eldsneytistæming og enduráfylling

Tæma skal eldsneytisgeymi ökutækisins og fylla hann með viðmiðunareldsneyti að 40% ± 2% af nafnrúmtaki geymisins við 18 °C ± 2 °C hita.

6.6.1.11. Varmajafnvægismeðhöndlun

Ökutækið skal síðan látið standa kyrrt í a.m.k. 6 klukkustundir og að hámarki í 36 klukkustundir á varmajafnvægissvæðinu við 20 °C ± 2 °C til að stöðga hitastig eldsneytisins.

6.6.1.12. Þrýstingsfall í eldsneytisgeymi

Síðan skal losa þrýstinginn í eldsneytisgeyminum til að auka ekki þrýstinginn innan í eldsneytisgeyminum með óeðlilegum hætti. Þetta má gera með því að opna eldsneytisgeymislok ökutækisins. Óháð því hvaða aðferð er notuð við þrýstingsfall skal ökutækið fært aftur í upprunalegt ástand innan 1 mínútu. Eftir þessa aðgerð skal tengja aftur geymslueininguna fyrir gufur.

6.6.1.13. Fylgja skal aðferðunum í liðum 6.5.6 til 6.5.9.8 í þessum viðbæti.

6.6.2. Ef þrýstingslosun í eldsneytisgeymi er lægri en 30 kPa

Prófunin skal fara fram eins og lýst er í liðum 6.6.1.1 til 6.6.1.13 í þessum viðbæti. Í þessu tilviki skal þó mynstrið fyrir losunarprófunina á sólarhring sem tilgreint er í töflu VI.1 í þessum viðbæti koma í stað fyrir umhverfishitann sem lýst er í lið 6.5.9.1 í þessum viðbæti.

Tafla VI.1

Snið umhverfishita í staðgöngurununni fyrir þéttlokað eldsneytisgeymiskerfi

Tími (klukkustundir)	Hitastig (°C)
0/24	20,0
1	20,4
2	20,8
3	21,7
4	23,9
5	26,1
6	28,5
7	31,4
8	33,8
9	35,6
10	37,1
11	38,0
12	37,7
13	36,4
14	34,2
15	31,9
16	29,9
17	28,2
18	26,2
19	24,7
20	23,5
21	22,3
22	21,0
23	20,2

6.7. Sjálfstæð prófunaraðferð fyrir þéttlokuð eldsneytisgeymiskerfi

6.7.1 Mæling á massa hleðslu vegna blásturstaps af völdum þrýstingsfalls

6.7.1.1. Nota skal aðferðirnar í liðum 6.6.1.1 til 6.6.1.7.2 í þessum viðbæti. Massi hleðslu vegna blásturstaps af völdum þrýstingsfalls er skilgreindur sem mismunurinn á þyngd hylkisins í ökutækinu áður en lið 6.6.1.6. í þessum viðbæti er beitt og eftir að lið 6.6.1.7.2 í þessum viðbæti er beitt.

6.7.1.2. Tap vegna yfirfalls blásturs við þrýstingsfall úr hylki ökutækisins skal mælt í samræmi við liði 6.6.1.8.1 og 6.6.1.8.2 í þessum viðbæti og skal uppfylla kröfurnar í lið 6.6.1.8.3 í þessum viðbæti.

6.7.2. Prófun á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á og sólarhringsprófun á tapi í gegnum losun við uppgufun

6.7.2.1. Ef þrýstingslosun í eldsneytisgeymi er 30 kPa eða meiri

6.7.2.1.1. Prófunin skal fara fram eins og lýst er í liðum 6.5.1 til 6.5.3 og í liðum 6.6.1.9 til 6.6.1.9.1 í þessum viðbæti.

6.7.2.1.2. Hylkið skal látið eldast í samræmi við röðina sem lýst er í lið 5.1 í þessum viðbæti og það skal hlaðið og hreinsað í samræmi við lið 6.6.1.5 í þessum viðbæti.

6.7.2.1.3. Hylki sem hefur verið látið eldast skal síðan hlaðið í samræmi við aðferðina sem lýst er í lið 5.1.6 í 7. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, að undanteknum massa hleðslu. Ákvarða skal heildarmassa hleðslu í samræmi við lið 6.7.1.1 í þessum viðbæti. Að beiðni framleiðanda er að öðrum kosti heimilt að nota viðmiðunareldsneyti í stað fyrir bútan. Aftengja skal hylkið.

6.7.2.1.4. Fylgja skal aðferðunum í liðum 6.6.1.10 til 6.6.1.13 í þessum viðbæti.

6.7.2.2. Ef þrýstingslosun í eldsneytisgeymi er lægri en 30 kPa

Prófunin skal fara fram eins og lýst er í liðum 6.7.2.1.1 til 6.7.2.1.4 í þessum viðbæti. Í þessu tilviki skal þó breyta umhverfishitanum sem lýst er í lið 6.5.9.1 í þessum viðbæti samkvæmt mynstrinu fyrir losunarprófunina á sólarhring sem tilgreint er í töflu VI.1 í þessum viðbæti.

7. Útreikningur á niðurstöðum úr prófun á losun við uppgufun

7.1. Prófanirnar á losun við uppgufun sem lýst er í þessum viðauka gera kleift að reikna út losun vetniskolvetnis í prófuninni á á tapi vegna yfirfalls blásturs, í sólarhringsprófuninni og í prófuninni á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á. Tap vegna uppgufunar í hvorri þessara prófana skal reiknað með því að nota upphafs- og lokagildi vetniskolefnastyrks, hitastigs og þrýstings í klefanum, ásamt nettórúmmáli þess.

Nota skal eftirfarandi jöfnu:

$$M_{HC} = k \times V \times \left(\frac{C_{HCf} \times P_f}{T_f} - \frac{C_{HCi} \times P_i}{T_i}\right) + M_{HC,out} - M_{HC,in}$$

þar sem:

M_{HC} er massi vetniskolefna í grömmum,

$M_{HC,out}$ er massi vetniskolefna, í grömmum, sem berst út úr klefanum þegar um er að ræða prófunarklefa með föstu rúmmáli fyrir prófun á losun á sólarhring,

$M_{HC,in}$ er massi vetniskolefna, í grömmum, sem berst inn í klefann, þegar um er að ræða prófunarklefa með föstu rúmmáli fyrir prófun á losun á sólarhring,

C_{HC} er mældur styrkur vetniskolefna í prófunarklefa, milljónarhlutar rúmmáls í C_1 -jafngildi,

V er nettórúmmál prófunarklefa, í m^3, að leiðrétt fyrir rúmmáli ökutækis með glugga og farangursrými opin. Ef rúmmál ökutækisins er ekki þekkt skal draga 1,42 m^3 frá,

T er umhverfishitastigið í klefanum, K,

P er loftþrýstingur, kPa,

H/C er hlutfall vetnis og kolefnis

þar sem:

H/C telst vera 2,33 við mælingu á tapi vegna yfirfalls blásturs í lokuðu rými til að ákvarða uppgufun og tap vegna uppgufunar í sólarhringsprófun,

H/C telst vera 2,20 fyrir losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi kemst á,

k er $1{,}2 \times 10^{-4} \times (12 + H/C)$ í $(g \times K/(m^3 \times kPa))$,

i er upphaflega niðurstaðan,

f er endanlega niðurstaðan.

7.2. Niðurstaðan úr $(M_{HS} + M_{D1} + M_{D2} + (2 \times PF))$ skal vera undir þeim mörkum sem skilgreind eru í lið 6.1.

8. **Prófunarskýrsla**

Prófunarskýrslan skal a.m.k. innihalda eftirfarandi þætti:

a) Lýsingu á tímabilum þegar varmajafnvægi er komið á, þ.m.t. tímalengd og meðalhiti,

b) lýsingu á hylki, sem hefur verið látið eldast, og tilvísun í nákvæma skýrslu um öldrun,

c) meðalhita við prófun á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi er komið á,

d) mælingar við prófun á losun við uppgufun á meðan heitvarmajafnvægi er komið á (HSL),

e) mælingar fyrsta sólarhringinn, DL1. dagur,

f) mælingar annan sólarhringinn, DL2. dagur,

g) lokaniðurstöðu prófunar á losun við uppgufun sem reiknuð er út í samræmi við 7. mgr. í þessum viðbæti,

h) yfirlýsta þrýstingslosun í eldsneytisgeymi kerfisins (fyrir þéttlokuð eldsneytisgeymslukerfi),

i) hleðslugildi blásturstaps (ef um er að ræða sjálfstæðu prófunina sem lýst er í lið 6.7 í þessum viðbæti).“

———

V. VIÐAUKI

Ákvæðum IX. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Í stað 3. liðar í A-þætti kemur eftirfarandi:

„3. Tæknigögn um eldsneyti sem notað er fyrir prófun á ökutækjum með efnarafala

Gerð: Vetni fyrir ökutæki með efnarafala

Eiginleikar	Einingar	Mörk		Prófunaraðferð
		lágmark	hámark	
Stuðull fyrir vetniseldsneyti ([a])	% mólhlutfall	99,97		
Heildarmagn gass sem er ekki vetni	míkrómól/mól		300	
Hámarksstyrkur einstakra aðskotaefna				
Vatn (H_2O)	míkrómól/mól		5	([e])
Heildarmagn vetniskolefna ([b]) (á grundvelli metans)	míkrómól/mól		2	([e])
Súrefni (O_2)	míkrómól/mól		5	([e])
Helíum (He)	míkrómól/mól		300	([e])
Heildarmagn köfnunarefnis (N_2) og argons (Ar) ([b])	míkrómól/mól		100	([e])
Koltvísýringur (CO_2)	míkrómól/mól		2	([e])
Kolsýringur (CO)	míkrómól/mól		0,2	([e])
Heildarmagn brennisteinssambanda ([c]) (á grundvelli H_2S)	míkrómól/mól		0,004	([e])
Formaldehýð (HCHO)	míkrómól/mól		0,01	([e])
Maurasýra (HCOOH)	míkrómól/mól		0,2	([e])
Ammoníak (NH_3)	míkrómól/mól		0,1	([e])
Heildarmagn halógenaðra efnasambanda ([d]) (á grundvelli halógenaðra jóna)	míkrómól/mól		0,05	([e])

Hvað varðar viðbætna efnisþætti eins og heildarmagn vetniskolefna og heildarmagn brennisteinssambanda á summa efnisþáttanna að vera minni en eða jafn mikil og leyfilegt gildi.

([a]) Stuðullinn fyrir vetniseldsneyti er ákvarðaður með því að draga „heildarmagn gass sem er ekki vetni“ í þessari töflu, gefið upp sem mólhlutfall, frá 100% mólhlutfalli.

([b]) Súrefnismettaðar lífrænar tegundir eru taldar með í heildarmagni vetniskolefna. Heildarmagn vetniskolefna skal mælt á grundvelli kolefna (µmólC/mól). Heildarmagn vetniskolefna má einungis fara yfir 2 míkrómól/mól vegna þess að metan er til staðar, en í því tilviki skal summun metans, köfnunarefnis og argons ekki vera meiri en 100 míkrómól/mól.

([c]) Heildarmagn brennisteinssambanda inniheldur að lágmarki H_2S, COS, CS_2 og merkaptön sem eru venjulega til staðar í jarðgasi.

([d]) Heildarmagn halógenaðra efnasambanda nær til dæmis yfir vetnisbróm (HBr), vetnisklóríð (HCl), klór (Cl_2) og lífræn halíð (R-X).

([e]) Skjalfesta skal prófunaraðferðir.“

VI. VIÐAUKI

„XI. VIÐAUKI

INNBYGGÐ GREININGARKERFI FYRIR VÉLKNÚIN ÖKUTÆKI

1. INNGANGUR

1.1. Í þessum viðauka eru settir fram starfrænir þættir innbyggðra greiningarkerfa fyrir mengunarvarnir í vélknúnum ökutækjum.

2. SKILGREININGAR, KRÖFUR OG PRÓFANIR

2.1. Skilgreiningarnar, kröfurnar og prófanirnar á innbyggðum greiningarkerfum eru settar fram í 2. og 3. lið 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 skulu gilda að því er varðar þennan viðauka, en undanþágum frá þeim kröfum er lýst í þessum viðauka.

2.1.1. Skilja ber inngangstexta við 2. lið 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„Að því er varðar þennan viðauka eingöngu:“.

2.1.2. Skilja ber lið 2.10 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„„Akstурslota“: lota sem samanstendur af ræsingu hreyfils, aksturslagi þar sem bilun kæmi fram ef um bilun væri að ræða, og stöðvun hreyfilsins.“

2.1.3. Til viðbótar við kröfurnar í lið 3.2.2 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 má einnig framkvæma greiningu á sliti eða bilunum utan akstурslotu (t.d. eftir að hreyfill hefur verið stöðvaður).

2.1.4. Skilja ber lið 3.3.3.1 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„3.3.3.1. Minnkandi skilvirkni hvarfakútsins með tilliti til losunar á heildarmagni vetniskolefna, annarra en metans, og köfnunarefnisoxíða. Framleiðendur geta vaktað fremsta hvarfakútinn eingöngu eða ásamt næsta hvarfakút fyrir aftan. Líta skal svo á að hver vaktaður hvarfakútur eða samtengdir hvarfakútar séu bilaðir þegar losun er yfir viðmiðunargildum vetniskolefna, annarra en metans, eða köfnunarefnisoxíða sem kveðið er á um í lið 3.3.2 í þessum viðauka.“

2.1.5. Litið skal svo á að með tilvísun í viðmiðunargildin í lið 3.3.3.1 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísun í viðmiðunargildin í lið 2.3 í þessum viðauka.

2.1.6. Frátekið til notkunar síðar.

2.1.7. Ákvæði liðar 3.3.4.9 og 3.3.4.10 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 gilda ekki.

2.1.8. Skilja ber liði 3.3.5 til 3.3.5.2 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„3.3.5. Framleiðendur geta sýnt gerðarviðurkenningaryfirvaldinu fram á að ekki þurfi að hafa eftirlit með ákveðnum íhlutum eða kerfum ef losun fer ekki yfir viðmiðunargildi innbyggðra greiningarkerfisins í lið 3.3.2 í þessum viðauka ef þau bila alveg eða eru fjarlægð.

3.3.5.1. Eftirfarandi búnað ætti þó að vakta með tilliti til allsherjarbilunar eða hvort hann sé fjarlægður (ef fjarlæging myndi valda því að farið er yfir gildandi losunarmörk í lið 5.3.1.4 í þessari reglugerð):

a) Agnasíu sem sett er á hreyfla með þjöppukveikju, hvort sem hún er sett upp sem sjálfstæð eining eða samþætt samsettum mengunarvarnarbúnaði,

b) eftirmeðferðarkerfi fyrir köfnunarefnisoxíð sem sett er á hreyfla með þjöppukveikju, hvort sem það er sett upp sem sjálfstæð eining eða samþætt samsettum mengunarvarnarbúnaði,

c) dísiloxunarhvata sem settur er á hreyfla með þjöppukveikju, hvort sem hann er settur upp sem sjálfstæð eining eða samþættur samsettum mengunarvarnarbúnaði.

3.3.5.2. Búnaðurinn, sem um getur í lið 3.3.5.1 þessa viðauka, skal einnig vaktaður með tilliti til bilunar sem gæti valdið því að farið er yfir gildandi viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins.“

2.1.9. Skilja ber lið 3.8.1 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„Innbyggða greiningarkerfið má eyða bilanakóða, ekinni vegalengd og læstu mæligildi ef sama bilun er ekki endurskráð í a.m.k. 40 hreyfilupphitunarlotum eða 40 akturslotum þar sem ökutækið er notað á þann hátt að viðmiðanirnar, sem eru tilgreindar í a- til c-lið liðar 7.5.1 í 1. viðbæti 11. viðauka, eru uppfylltar.“

2.1.10. Skilja ber tilvísun í „ISO DIS 15031 5“ í lið 3.9.3.1 í 11. viðbæti við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„… staðlinum sem tilgreindur er í a-lið liðar 6.5.3.2 í 1. viðbæti 11. viðauka við þessa reglugerð.“

2.1.11. Eftirfarandi skal gilda til viðbótar við kröfurnar í lið 3 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„Viðbótarákvæði um ökutæki sem nota aðferðir fyrir stöðvun hreyfils

Akturslota

Sjálfvirk endurræsing hreyfils samkvæmt skipun frá stjórnkerfi hreyfilsins í kjölfar stöðvunar hreyfils getur talist ný akturslota eða áframhald yfirstandandi lotu.“

2.2. Litið skal svo á að með endingarvegalengd prófunar V og endingarprófun V, sem kveðið er á um í liðum 3.1 og 3.3.1 í 11. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, sé, eftir því sem við á, átt við tilvísun í kröfurnar í VII. viðauka þessarar reglugerðar.

2.3. Litið skal svo á að með viðmiðunargildum innbyggða greiningakerfisins, sem tilgreind eru í lið 3.3.2 í 11. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, sé átt við tilvísun í kröfurnar sem tilgreindar eru í liðum 2.3.1 og 2.3.2 hér að neðan:

2.3.1. Í eftirfarandi töflu eru tilgreind þau viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins sem gilda fyrir ökutæki sem eru gerðarviðurkennd í samræmi við losunarmörkin samkvæmt Euro 6, sem sett eru fram í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007, þremur árum eftir dagsetningarnar sem tilgreindar eru í 4. og 5. mgr. 10. gr. þeirrar reglugerðar:

Endanleg viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins samkvæmt Euro 6

		Viðmiðunar-massi (RM) (kg)	Massi kolsýrings		Massi vetniskolefna, annarra en metans		Massi köfnunar-efnisoxíða		Massi efnisagna (1)		Fjöldi agna (2)	
Flokkur	Undir-flokkur		(CO) (mg/km)		(NMHC) (mg/km)		(NO_x) (mg/km)		(PM) (mg/km)		(PN) (#/km)	
			PI	CI	PI	CI	PI	CI	CI	PI	CI	PI
M	—	Allir	1 900	1 750	170	290	90	140	12	12		
N_1	I	RM ≤ 1 305	1 900	1 750	170	290	90	140	12	12		
	II	1 305 < RM ≤ 1 760	3 400	2 200	225	320	110	180	12	12		
	III	1 760 < RM	4 300	2 500	270	350	120	220	12	12		
N_2	—	Allir	4 300	2 500	270	350	120	220	12	12		

Skýringar: PI = rafkveikja, CI = þjöppukveikja.

(1) Mörkin fyrir agnamassa og agnafjölda fyrir ökutæki með rafkveikju gilda einungis um ökutæki sem hafa hreyfla með beinni innsprautun.

(2) Mörkin fyrir agnafjölda má innleiða síðar.

2.3.2. Í allt að þrjú ár eftir dagsetningarnar sem eru tilgreindar í 4. og 5. mgr. 10. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007 fyrir nýjar gerðarviðurkenningar annars vegar og ný ökutæki hins vegar, gilda eftirfarandi viðmiðunargildi innbyggðra greiningarkerfisins um ökutæki sem eru gerðarviðurkennd í samræmi við losunarmörkin samkvæmt Euro 6, sem sett eru fram í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007, að vali framleiðanda:

Bráðabirgðaviðmiðunargildi innbyggðra greiningarkerfisins samkvæmt Euro 6

		Viðmiðunar-massi (RM) (kg)	Massi kolsýrings		Massi vetniskolefna, annarra en metans		Massi köfnunarefnisoxíða		Massi efnisagna (PM) (1)	
Flokkur	Undir-flokkur		(CO) (mg/km)		(NMHC) (mg/km)		(NO_x) (mg/km)		(PM) (mg/km)	
			PI	CI	PI	CI	PI	CI	CI	PI
M	—	Allir	1 900	1 750	170	290	150	180	25	25
N_1	I	RM ≤ 1 305	1 900	1 750	170	290	150	180	25	25
	II	1 305 < RM ≤ 1 760	3 400	2 200	225	320	190	220	25	25
	III	1 760 < RM	4 300	2 500	270	350	210	280	30	30
N_2	—	Allir	4 300	2 500	270	350	210	280	30	30

Skýringar: PI = rafkveikja, CI = þjöppukveikja

(1) Mörk fyrir agnamassa fyrir ökutæki með rafkveikju gilda einungis um ökutæki sem hafa hreyfla með beinni innsprautun.

2.4.

2.5. Frátekið til notkunar síðar.

2.6. Prófunarlota prófunar I, sem um getur í lið 3.3.3.2 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, skal talin vera sama prófunarlota prófunar I og notuð var í a.m.k. tveimur samfelldum lotum eftir að miskveikingarbilanir eru framkallaðar í samræmi við lið 6.3.1.2 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.

2.7. Litið skal svo á að með tilvísun í þau viðmiðunargildi fyrir agnir sem kveðið er á um í lið 3.3.2 í lið 3.3.3.7 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, sé átt við tilvísun í þau viðmiðunargildi fyrir agnir sem kveðið er á um í lið 2.3 í þessum viðauka.

2.8. Skilja ber lið 3.3.3.4 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„3.3.3.4. Ef þeir eru virkir með völdu eldsneyti, aðrir mengunarvarnaríhlutir eða -kerfi eða mengunarvarnartengdir íhlutir aflrása eða kerfa sem eru tengd við tölvu, þar sem bilun gæti orsakað losun mengunarefna gegnum útblástursrör sem færi yfir viðmiðunarmörk innbyggða greiningarkerfisins sem sett eru fram í lið 3.3.2 í þessum viðauka.“

2.9. Skilja ber lið 3.3.4.4 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„3.3.4.4. Aðrir mengunarvarnaíhlutir eða -kerfi eða mengunarvarnatengdir íhlutir aflrása eða -kerfa sem eru tengd við tölvu, þar sem bilun gæti orsakað losun með útblæstri sem færi yfir viðmiðunarmörkin í lið 3.3.2 í þessum viðauka. Dæmi um slík kerfi eða íhluti eru þau sem vakta og stjórna streymi loftmassa, streymi loftflæðirúmmáls (og hitastigi), forþjöppunarþrýstingi og þrýstingi í soggrein (ásamt viðeigandi nemum til að gera þessa virkni mögulega).“

3. STJÓRNSÝSLUÁKVÆÐI VARÐANDI ÁGALLA Í INNBYGGÐUM GREININGARKERFUM

3.1. Stjórnsýsluákvæði varðandi ágalla í innbyggðum greiningarkerfum sem sett eru fram í 2. mgr. 6. gr. skulu vera þau sem tilgreind eru í 4. lið í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, með eftirfarandi undantekningum.

3.2. Litið skal svo á að með tilvísun í viðmiðunargildi innbyggðra greiningarkerfisins í lið 4.2.2 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísun í viðmiðunargildi innbyggðra greiningarkerfisins í lið 2.3 í þessum viðauka.

3.3. Lið 4.6 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 skal skilja á eftirfarandi hátt:

„Viðurkenningaryfirvaldinu ber að tilkynna um ákvörðun sína þess efnis að veita leyfi vegna ágalla í samræmi við 2. mgr. 6. gr.“

4. AÐGANGUR AÐ UPPLÝSINGUM UM INNBYGGÐA GREININGARKERFIÐ

4.1. Kröfur er varða aðgang að upplýsingum innbyggðs greiningarkerfis eru tilgreindar í lið 5 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83. Undanþágum frá þessum kröfum er lýst í eftirfarandi liðum.

4.2. Litið skal svo á að með tilvísunum í 1. viðbæti við 2. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísanir í 5. viðbæti við I. viðauka þessarar reglugerðar.

4.3. Litið skal svo á að með tilvísunum í lið 3.2.12.2.7.6 í 1. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísanir í lið 3.2.12.2.7.6 í 3. viðbæti við I. viðauka þessarar reglugerðar.

4.4. Litið skal svo á að með „samningsaðilum“ sé átt við „aðildarríki.“

4.5. Litið skal svo á að með tilvísun í viðurkenningu, sem veitt er samkvæmt reglugerð nr. 83, sé átt við tilvísun í gerðarviðurkenningu, sem veitt er samkvæmt þessari reglugerð og reglugerð (EB) nr. 715/2007.

4.6. Litið skal svo á að með gerðarviðurkenningu efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu sé átt við EB-gerðarviðurkenningu.

———

1. viðbætir

VIRKNI INNBYGGÐRA GREININGARKERFA (OBD)

1. INNGANGUR

1.1. Í þessum viðbæti er lýst aðferðinni fyrir þá prófun sem gera skal skv. 2. lið þessa viðauka.

2. TÆKNILEGAR KRÖFUR

2.1. Tæknilegar kröfur og forskriftir skulu vera þær sem settar eru fram í 1. viðbæti við 11. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, með þeim undantekningum og viðbótarkröfum sem lýst er í eftirfarandi liðum.

2.2. Litið skal svo á að með tilvísunum í viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins í 1. viðbæti við 11. við reglugerð efnahagsnefnd Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, sem sett eru fram í lið 3.3.2 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, sé átt við tilvísanir í viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins sem sett eru fram í lið 2.3 í þessum viðauka.

2.3. Litið skal svo á að með tilvísun í prófunarlotu prófunar I í lið 2.1.3 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísun í prófun 1 samkvæmt reglugerð (EB) nr. 692/2008 eða XXI. viðauka við þessa reglugerð, að vali framleiðanda fyrir hverja einstaka bilun sem sýna skal fram á.

2.4. Litið skal svo á að með tilvísun í þau viðmiðunareldsneyti sem tilgreind eru í lið 3.2 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísun í viðeigandi forskriftir fyrir viðmiðunareldsneyti í IX. viðauka þessarar reglugerðar.

2.5. Skilja ber lið 6.4.1.1 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„6.4.1.1. Eftir að ökutæki hefur verið undirbúið í samræmi við lið 6.2 í þessum viðauka skal ökutækinu ekið í gegnum prófun I (fyrsta og annan hluta).

Bilanavísirinn skal fara í gang í síðasta lagi áður en prófuninni lýkur við öll þau skilyrði sem um getur í liðum 6.4.1.2 til 6.4.1.5 í þessum viðauka. Bilanavísirinn má einnig virkjast meðan á formeðhöndlun stendur. Í stað framangreindra skilyrða er tækniþjónustunni heimilt að notast við önnur skilyrði í samræmi við lið 6.4.1.6 í þessum viðauka. Eftir sem áður skal fjöldi bilana, sem líkt er eftir, ekki vera fleiri en fjórar (4) með tilliti til gerðarviðurkenningar.

Ef um er að ræða prófun á tvíeldsneytisökutæki, knúið gasi, skulu báðar tegundir eldsneytis notaðar í mesta lagi fyrir fjórar (4) bilanir að vali gerðarviðurkenningaryfirvaldsins.“

2.6. Litið skal svo á að með tilvísun í 11. viðauka í lið 6.5.1.4 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 sé átt við tilvísun í XI. viðauka þessarar reglugerðar.

2.7. Eftirfarandi skal gilda til viðbótar við kröfurnar í 2. mgr. 1. liðar 1. viðbætis við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„Ef um er að ræða rafmagnsbilanir (skammhlaup/opna rás) má losun fara meira en 20% yfir þau mörk sem gefin eru í lið 3.3.2.“

2.8. Skilja ber lið 6.5.3 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„6.5.3. Aðgangur að greiningarkerfi mengunarvarnabúnaðar skal vera staðlaður og óhindraður og í samræmi við eftirfarandi ISO-staðla og/eða SAE-forskrift. Nota má seinni útgáfur ef einhverjir af eftirfarandi stöðlum hafa verið afturkallaðir og í stað þeirra komi viðeigandi staðlastofnun.

6.5.3.1. Nota skal eftirfarandi staðal sem tengil fyrir samskipti milli ökutækis og ytra umhverfis:

a) ISO 15765-4:2011 „Road vehicles – Diagnostics on Controller Area Network (CAN) – Part 4: Requirements for emission-related systems“ frá apríl 2016.

6.5.3.2. Staðlar sem eru notaðir í tengslum við sendingu á viðeigandi upplýsingum um innbyggða greiningakerfið:

a) ISO 15031-5 „Road vehicles – communication between vehicles and external test equipment for emissions-related diagnostics – Part 5: Emissions-related diagnostic services“, frá ágúst 2015 eða SAE J1979 frá febrúar 2017,

b) ISO 15031-4 „Road vehicles – Communication between vehicle and external equipment for emissions-related diagnostics – Part 4: External test equipment, frá febrúar 2014 eða SAE J1978 frá 30. apríl 2002,

c) ISO 15031-3 Road vehicles – Communication between vehicle and external equipment for emissions-related diagnostics Part 3: Diagnostic connector and related electrical circuits: specification and use, frá apríl 2016 eða SAE J1962 frá 26. júlí 2012,

d) ISO 15031-6 “Road vehicles – Communication between vehicle and external test equipment for emissions related diagnostics – Part 6: Diagnostic trouble code definitions”, frá ágúst 2015 eða SAE J2012 frá 7. mars 2013,

e) ISO 27145 „Road vehicles – Implementation of World-Wide Harmonized On-Board Diagnostics (WWH-OBD)“ frá 15. ágúst 2012 með þeirri takmörkun að eingöngu megi nota ákvæði a-liðar í lið 6.5.3.1 fyrir gagnatengingu,

f) ISO 14229:2013 „Road vehicles – Unified diagnostic services (UDS) með þeirri takmörkun að eingöngu megi nota ákvæði a-liðar í lið 6.5.3.1 fyrir gagnatengingu“.

Staðlana í e- og f-lið má í fyrsta lagi nota 1. janúar 2019 sem valkost við a-lið.

6.5.3.3. Prófunarbúnaður og greiningartæki, sem eru nauðsynleg til samskipta við innbyggða greiningarkerfið, skulu að lágmarki uppfylla notkunarforskriftina sem gefin er upp í staðlinum sem tilgreindur er í b-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti.

6.5.3.4. Grunngögn um greiningar (eins og tilgreint er í lið 6.5.1) og upplýsingar um tvíátta eftirlit skulu gefin á því sniði og í þeim einingum sem lýst er í staðlinum sem er tilgreindur í a-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti, og verða að vera aðgengileg í gegnum greiningartæki sem uppfyllir skilyrði staðalsins sem er tilgreindur í b-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti.

Ökutækjaframleiðandinn skal láta landsbundinni staðlastofnun í té upplýsingar um öll losunartengd greiningargögn, s.s. auðkenni mæliþátta (PID), auðkenni fyrir vaktara innbyggða greiningarkerfisins og prófunarkenni sem eru ekki tilgreind í staðlinum sem er tilgreindur í a-lið liðar 6.5.3.2 í þessari reglugerð, en tengjast þessari reglugerð.

6.5.3.5. Þegar bilun er skráð skal framleiðandinn greina bilunina með hjálp viðeigandi ISO/SAE-bilanakóða sem tilgreindur er í einum af stöðlunum sem eru taldir upp í d-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti varðandi „kerfisgreiningarkóða bilana sem tengjast losun“. Ef ekki er unnt að greina bilunina á þennan hátt getur framleiðandinn notað bilanagreiningarkóða sem framleiðandinn stýrir í samræmi við sama staðal. Bilanakóðarnir skulu vera að fullu aðgengilegir með stöðluðum greiningarbúnaði sem uppfyllir ákvæði liðar 6.5.3.3 í þessum viðbæti.

Ökutækjaframleiðandinn skal láta landsbundinni staðlastofnun í té upplýsingar um öll losunartengd greiningargögn, s.s. auðkenni mæliþátta (PID), auðkenni fyrir vaktara innbyggða greiningarkerfisins og prófunarkenni sem eru ekki tilgreind í stöðlunum sem tilgreindir eru í a-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti, en tengjast þessari reglugerð.

6.5.3.6. Tengildi milli ökutækis og greiningarprófunarbúnaðar skal vera staðlað og standast allar kröfur staðalsins sem er tilgreindur í c-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti. Staðsetning uppsetningar skal háð samþykki stjórnsýslustofnunarinnar og vera þannig að þjónustuaðili komist auðveldlega að henni en hún sé jafnframt varin gegn því að ófaglært starfsfólk geti átt við hana.

6.5.3.7. Framleiðandinn skal einnig gera tiltækar, gegn greiðslu ef við á, tæknilegar upplýsingar sem nauðsynlegar eru fyrir viðgerð eða viðhald á vélknúnum ökutækjum, nema slíkar upplýsingar falli undir hugverkaréttindi eða teljist innihalda nauðsynlega, leynilega verkþekkingu, sem liggur fyrir í viðeigandi formi; í slíkum tilvikum er óheimilt að neita um nauðsynlegar tæknilegar upplýsingar að óréttmætu.

Þeir aðilar sem eiga rétt á aðgangi að þessum upplýsingum eru allir þeir sem hafa atvinnu af viðhaldi eða viðgerðum, veita vegaaðstoð, sinna ökutækjaskoðunum eða -prófunum og allir þeir sem framleiða eða selja varahluti eða endurbótaíhluti, greiningartæki og prófunarbúnað.“

2.9. Eftirfarandi skal gilda til viðbótar við kröfurnar í lið 6.1 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„Ekki þarf að framkvæma prófun I til að sýna fram á rafmagnsbilanir (skammhlaup/opnar rásir). Framleiðandinn má sýna fram á þessar bilanir við akstursskilyrði þar sem íhluturinn er notaður og vöktunarskilyrðin koma upp. Þessi skilyrði skulu skrásett í gerðarviðurkenningarskjalið.“

2.10. Skilja ber lið 6.2.2 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„Að ósk framleiðanda er heimilt að beita öðrum og/eða viðbótaraðferðum við formeðhöndlun.“

2.11. Eftirfarandi skal gilda til viðbótar við kröfurnar í lið 6.2 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„Notkun á viðbótarformeðhöndlunarlotum eða öðrum formeðhöndlunaraðferðum skal skráð í gerðarviðurkenningargögnin.“

2.12. Skilja ber lið 6.3.1.5 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„Rafmagnsaftenging rafeindastýrðs hreinsibúnaðar fyrir uppgufun (ef slíkur búnaður er til staðar og virkur við notkun valinnar eldsneytistegundar).“

2.13. Frátekið til notkunar síðar.

2.14. Skilja ber lið 6.4.2.1 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„Eftir að ökutæki hefur verið formeðhöndlað í samræmi við lið 6.2 þessa viðauka skal ökutækinu ekið í gegnum prófun I (fyrsta og annan hluta).

Bilanavísirinn skal fara í gang í síðasta lagi áður en prófuninni lýkur við öll þau skilyrði sem um getur í liðum 6.4.2.2 til 6.4.2.5. Bilanavísirinn má einnig virkjast meðan á formeðhöndlun stendur. Í stað framangreindra skilyrða er tækniþjónustunni heimilt að notast við önnur skilyrði í samræmi við lið 6.4.2.5 í þessum viðauka. Eftir sem áður skal fjöldi bilana, sem líkt er eftir, ekki vera meiri en fjórar (4) með tilliti til gerðarviðurkenningar.“

2.15. Upplýsingarnar sem koma fram í 3. lið í XXII. viðauka skulu gerðar aðgengilegar í formi merkja sem berast með notkun þess raðtengis sem um getur í c-lið liðar 6.5.3.2 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 og í þeim skilningi sem settur er fram í lið 2.8 í 1. viðbæti við þennan viðauka.

3. FRAMMISTAÐA VIÐ NOTKUN

3.1. **Almennar kröfur**

Tæknilegar kröfur og forskriftir skulu vera þær sem settar eru fram í 1. viðbæti við 11. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, með þeim undantekningum og viðbótarkröfum sem lýst er í eftirfarandi liðum.

3.1.1. Skilja ber kröfur í lið 7.1.5 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

Að því er varðar nýjar gerðarviðurkenningar og ný ökutæki skal vaktarinn, sem er krafist samkvæmt lið 3.3.4.7 í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83, hafa frammistöðuhlutfall við notkun (IUPR) sem er stærra en eða jafnt og 0,1 í þrjú ár eftir dagsetningarnar sem eru tilgreindar í 4. og 5. mgr. 10. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007.

3.1.2. Skilja ber kröfur í lið 7.1.7 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

Framleiðandinn skal sýna viðurkenningaryfirvaldinu og, ef þess er óskað, framkvæmdastjórninni fram á að þessi tölfræðilegu skilyrði séu uppfyllt að því er varðar alla vaktara sem innbyggða greiningarkerfinu er skylt að tilkynna um í samræmi við lið 7.6 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð nr. 83, eigi síðar en 18 mánuðum eftir að fyrsta gerð ökutækisins, sem er með frammistöðuhlutfall við notkun í ökutækjahópi með innbyggð greiningarkerfi, kemur á markað og þaðan í frá á 18 mánaða fresti. Að því er þetta varðar skal beita aðferðinni sem lýst er í II. viðauka fyrir ökutækjahópa með innbyggð greiningarkerfi, sem eru með fleiri en 1000 skráningar innan ESB og sem falla undir úrtak innan úrtakstímabilsins, með fyrirvara um ákvæði liðar 7.1.9 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð nr. 83.

Til viðbótar við kröfurnar sem settar eru fram í II. viðauka og án tillits til niðurstöðu úttektarinnar sem lýst er í 2. lið II. viðauka skal yfirvaldið, sem veitir viðurkenninguna, gera sannprófun á samræmi ökutækja í notkun m.t.t. frammistöðuhlutfalls við notkun, eins og lýst er í 1. viðbæti við II. viðauka, í viðeigandi fjölda tilvika sem ákveðin eru af handahófi. Með „viðeigandi fjölda tilvika sem ákveðin eru af handahófi“ er átt við að þetta úrræði hafi letjandi áhrif á brot gegn kröfunum í 3. lið þessa viðauka eða að lögð séu fram gögn sem hefur verið hagrætt, eru fölsuð eða eru ódæmigerð í tengslum við úttektina. Ef engar sérstakar aðstæður eru fyrir hendi sem gerðarviðurkenningaryfirvaldið getur sýnt fram á telst handahófskennd sannprófun á samræmi ökutækja í notkun á 5% af þeim gerðarviðurkenndu ökutækjahópum, sem eru með innbyggð greiningarkerfi, fullnægjandi til að staðfesta að farið sé að þessari kröfu. Í þessum tilgangi geta gerðarviðurkenningaryfirvöld komist að samkomulagi við framleiðandann um ráðstafanir til að draga úr tvöföldum prófunum á tilteknum ökutækjahópi, sem er með innbyggð greiningarkerfi, enda vinni það ekki gegn letjandi áhrifum eigin sannprófana gerðarviðurkenningaryfirvaldsins á brotum á kröfunum í 3. lið þessa viðauka að því varðar samræmi ökutækja í notkun. Við sannprófun á samræmi ökutækja í notkun er heimilt að nota gögn sem safnað er í gegnum eftirlitsáætlanir aðildarríkjanna. Sé þess óskað skulu gerðarviðurkenningaryfirvöld láta framkvæmdastjórninni og öðrum viðurkenningaryfirvöldum í té gögn um úttektir og handahófsprófanir á samræmi ökutækja í notkun sem gerðar hafa verið, ásamt aðferðunum sem notaðar eru til að ákvarða þau tilvik sem handahófsprófanir á samræmi ökutækja í notkun eiga við um.

3.1.3. Leiði prófanirnar, sem lýst er í lið 3.1.2 í þessum viðbæti eða í lið 7.1.9 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð nr. 83, í ljós að ekki sé farið eftir kröfunum í lið 7.1.6 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð nr. 83 telst það brot er varðar viðurlög sem kveðið er á um í 13. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007. Þessi vísun takmarkar ekki beitingu slíkra viðurlaga vegna brota gegn öðrum ákvæðum reglugerðar (EB) nr. 715/2007 eða þessarar reglugerðar, sem vísa ekki með ótvíræðum hætti í 13. gr. reglugerðar (EB) nr. 715/2007.

3.1.4. Eftirfarandi skal koma í stað liðar 7.6.1 í 1. viðbæti í 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„7.6.1. Í samræmi við staðalinn sem er tilgreindur í a-lið liðar 6.5.3.2 í þessum viðbæti skal innbyggða greiningarkerfið veita upplýsingar um kveikjulotuteljarann og almenna nefnarann, ásamt sérteljurum og -nefnurum fyrir eftirfarandi vaktara, ef gerð er krafa í þessum viðauka um að þeir séu til staðar í ökutækinu:

a) Hvarfakúta (hver samstæða tilkynnt sérstaklega),

b) súrefnisskynjara/skynjara útblásturslofts, þ.m.t. aukasúrefnisskynjara

(hver skynjari tilkynntur sérstaklega),

c) uppgufunarkerfi,

d) útblástursþrýstingsrásarkerfi,

e) kerfi fyrir breytilega tímastillingu ventla,

f) aukaloftskerfi,

g) agnasíu,

h) NO_x-eftirmeðferðarkerfi (t.d. NO_x-gleypi, NO_x-kerfi með hvarfmiðli/hvata),

i) stjórnbúnað fyrir forþjöppuþrýsting.“

3.1.5. Skilja ber lið 7.6.2 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 á eftirfarandi hátt:

„7.6.2. Fyrir tiltekna íhluti eða kerfi sem eru með marga vaktara og sem skylt er að tilkynna um samkvæmt þessum lið (t.d. getur súrefnisskynjarasamstæða 1 verið með marga vaktara vegna svörunar skynjara eða annars konar eiginleika skynjara) skal innbyggða greiningarkerfið skrá teljara og nefnara aðskilið fyrir hvern tiltekinn vaktara og tilkynna aðeins samsvarandi teljara og nefnara fyrir tiltekinn vaktara sem er með lægsta tölulega hlutfallið. Ef tveir eða fleiri tilteknir vaktarar hafa sama hlutfall skal tilkynna samsvarandi teljara og nefnara fyrir tiltekinn vaktara sem hefur hæstan nefnara að því er varðar tiltekinn íhlut.“

3.1.6. Eftirfarandi skal gilda til viðbótar við kröfurnar í lið 7.6.2 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83:

„Teljarar og nefnarar fyrir tiltekna vaktara fyrir íhluti eða kerfi, sem vakta stöðugt fyrir bilunum vegna skammhlaups eða opnum rásum, eru undanþegnir tilkynningaskyldu.

„Stöðugt“ merkir í þessu samhengi að vöktun er alltaf virk og að sýnataka af því merki sem notað er við vöktunina fer fram a.m.k. tvisvar sinnum á sekúndu og skal staðfesting á því hvort bilun sé fyrir hendi eða ekki liggja fyrir innan 15 sekúndna.

Ef sýnataka á íhlut fyrir ílagsgögn frá tölvu fer sjaldnar fram í eftirlitsskyni má í staðinn meta merki íhlutarins í hvert skipti sem sýnataka fer fram.

Ekki er nauðsynlegt að virkja íhlut/kerfi frálags eingöngu í þeim tilgangi að vakta það frálag íhlutar/kerfis.“

———

2. viðbætir

GRUNDVALLAREIGINLEIKAR ÖKUTÆKJAHÓPSINS

Grundvallareiginleikar ökutækjahópsins skulu vera þeir sem tilgreindir eru í 2. viðbæti við 11. viðauka reglugerðar efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83.“

———

VII. VIÐAUKI

Ákvæðum XII. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Í stað fyrirsagnarinnar kemur eftirfarandi:

„GERÐARVIÐURKENNING ÖKUTÆKJA SEM BÚIN ERU VISTVÆNNI NÝSKÖPUN OG ÁKVÖRÐUN KOLTVÍSÝRINGSLOSUNAR OG ELDSNEYTISNOTKUNAR ÖKUTÆKJA SEM ERU LÖGÐ FRAM TIL FJÖLÞREPA GERÐARVIÐURKENNINGAR EÐA SKRÁNINGARVIÐURKENNINGAR ÖKUTÆKIS“

2) Liður 1.4 fellur brott.

3) Í stað 2. liðar kemur eftirfarandi:

„2. ÁKVÖRÐUN Á LOSUN KOLTVÍSÝRINGS OG ELDSNEYTISNOTKUN ÖKUTÆKJA SEM LÖGÐ ERU FRAM TIL FJÖLÞREPA GERÐARVIÐURKENNINGAR EÐA SKRÁNINGARVIÐURKENNINGAR ÖKUTÆKIS

2.1. Í þeim tilgangi að ákvarða koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun ökutækis sem er lagt fram til fjölþrepa gerðarviðurkenningar, eins og skilgreint er í 7. mgr. 3. gr. tilskipunar 2007/46/EB, gilda ráðstafanirnar í XXI. viðauka. Að vali framleiðandans og án tillits til tæknilega leyfilegs hámarksmassa með hleðslu er þó heimilt að nota þær aðrar ráðstafanir sem lýst er í liðum 2.2 til 2.6 ef grunnökutækið er ekki fullbúið.

2.2. Koma skal á fót ökumótstöðufylkjahópum, eins og þeir eru skilgreindir í lið 5.8 í XXI. viðauka, á grundvelli mæliþátta fyrir dæmigert fjölþrepa ökutæki í samræmi við lið 4.2.1.4 í 4. undirviðauka við XXI. viðauka.

2.3. Framleiðandi grunnökutækisins skal reikna út ökumótstöðustuðlana fyrir ökutæki H_M og L_M í ökumótstöðufylkjahópi, eins og sett er fram í 5. lið 4. undirviðauka við XXI. viðauka, og ákvarða koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun fyrir bæði ökutækin með prófun 1. Framleiðandi grunnökutækisins skal gera aðgengilegt reiknitól til að ákvarða, á grundvelli mæliþátta fjölþrepa fullbúinna ökutækja, endanlega eldsneytisnotkun og koltvísýringsgildi, eins og tilgreint er í 7. undirviðauka við XXI. viðauka.

2.4. Útreikningur á ökumótstöðu og ökukraftvægi einstaks fjölþrepa ökutækis skal framkvæmdur í samræmi við lið 5.1 í 4. undirviðauka við XXI. viðauka.

2.5. Framleiðandi síðasta framleiðsluþreps skal reikna út endanlega eldsneytisnotkun og koltvísýringsgildi á grundvelli mæliþáttanna fyrir fjölþrepa fullbúna ökutækið eins og tilgreint er í lið 3.2.4 í 7. undirviðauka XXI. viðauka og skal nota reiknitólið sem framleiðandi grunnökutækisins lætur í té.

2.6. Framleiðandi fjölþrepa fullbúna ökutækisins skal setja upplýsingar í samræmisvottorðið um fjölþrepa fullbúnu ökutækin og bæta við þau upplýsingunum um grunnökutækin í samræmi við IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB.

2.7. Ef um er að ræða fjölþrepa ökutæki sem lögð eru fram til gerðarviðurkenningar einstakra ökutækja skal skráningarviðurkenning ökutækisins innihalda eftirfarandi upplýsingar:

a) Losun koltvísýrings, mælda í samræmi við aðferðina sem sett er fram í liðum 2.1 til 2.6,

b) massa fjölþrepa fullbúna ökutækisins, tilbúins til aksturs,

c) auðkenniskóða sem samsvarar gerð, afbrigði og útfærslu grunnökutækisins,

d) gerðarviðurkenningarnúmer grunnökutækisins, ásamt númeri rýmkunar,

e) heiti og heimilisfang framleiðanda grunnökutækisins,

f) massa grunnökutækisins, tilbúins til aksturs.

2.8. Ef um er að ræða fjölþrepa gerðarviðurkenningar eða skráningarviðurkenningu ökutækis þar sem grunnökutækið er fullbúið ökutæki með gildandi samræmisvottorð skal framleiðandi síðasta framleiðsluþreps hafa samráð við framleiðanda grunnökutækisins til að stilla nýtt koltvísýringsgildi í samræmi við brúun á koltvísýringi með viðeigandi gögnum um fjölþrepa fullbúna ökutækið eða reikna út nýtt koltvísýringsgildi á grundvelli mæliþátta fyrir fjölþrepa fullbúna ökutækið eins og tilgreint er í lið 3.2.4 í 7. undirviðauka við XXI. viðauka og með því tóli sem framleiðandi grunnökutækis leggur fram, eins og tilgreint er í lið 2.3. hér á undan. Ef tólið er ekki aðgengilegt eða ef brúun á koltvísýringi er ekki möguleg skal nota koltvísýringsgildi hálosandi ökutækis úr grunnökutækinu í samkomulagi við viðurkenningaryfirvaldið.“

———

VIII. VIÐAUKI

„XVI. VIÐAUKI

KRÖFUR VARÐANDI ÖKUTÆKI SEM NOTA HVARFMIÐIL FYRIR EFTIRMEÐFERÐARKERFI ÚTBLÁSTURS

1. Inngangur

Í þessum viðauka eru settar fram kröfur fyrir ökutæki sem nota hvarfmiðil fyrir eftirmeðferðarkerfið í því skyni að draga úr losun. Skilja ber allar tilvísanir í hvarfmiðilsgeymi í þessum viðauka þannig að þær eigi líka við um aðra geyma sem innihalda hvarfmiðil.

1.1. Rúmtak hvarfmiðilsgeymis skal nægja til að ekki þurfi að fylla á hvarfmiðilsgeymi við meðaldrægni sem nemur fimm fullum eldsneytisgeymum að því tilskildu að auðvelt sé að fylla á hvarfmiðilsgeyminn (t.d. án þess að nota verkfæri og án þess að fjarlægja innri klæðningu ökutækis). Þegar innri loki er opnaður til að fá aðgang í þeim tilgangi að fylla á hvarfmiðil ber ekki að skilja það sem svo að fjarlægja þurfi innri klæðningu ökutækis). Ef ekki telst auðvelt að fylla á hvarfmiðilsgeymi eins og lýst er hér á undan skal lágmarksrúmtak hvarfmiðilsgeymisins samsvara a.m.k. meðaldrægni sem nemur 15 fullum eldsneytisgeymum. Ef um er að ræða valkostinn í lið 3.5 skulu ofangreindar takmarkanir á lágmarksrúmtaki hvarfmiðilsgeymis þó ekki gilda ef framleiðandinn velur að virkja viðvörunarkerfið þegar ekin hefur verið fjarlægð sem er ekki minni en svo að 2400 km séu eftir þar til hvarfmiðilsgeymirinn tæmist.

1.2. Í tengslum við þennan viðauka skal hugtakið „meðaldrægni“ teljast vera miðað við eldsneytisnotkun eða notkun hvarfmiðils við prófun 1 á drægni eldsneytisgeymis annars vegar og hvarfmiðilsgeymis hins vegar.

2. Vísir fyrir hvarfmiðil

2.1. Ökutækið skal hafa sérstakt viðvörunarljós í mælaborðinu sem gerir ökumanni viðvart þegar magn hvarfmiðils er undir þeim viðmiðunargildum sem tilgreind eru í lið 3.5.

3. Viðvörunarkerfi fyrir ökumann

3.1. Ökutækið skal vera búið viðvörunarkerfi sem veitir sjónræna viðvörun sem upplýsir ökumanninn þegar afbrigðileiki greinist við skömmtun hvarfmiðils, t.d. ef losun er of mikil, magn hvarfmiðilsins er orðið lítið, skömmtun hvarfmiðilsins er rofin eða ef hvarfmiðillinn uppfyllir ekki gæðaviðmið sem tilgreind eru af framleiðanda. Viðvörunarkerfið má einnig vera búið heyranlegu merki sem varar ökumanninn við.

3.2. Styrkleiki merkisins frá viðvörunarkerfinu skal stigmagnast þegar hvarfmiðillinn er við það að verða uppurinn. Það skal ná hámarki með viðvörun til ökumanns sem ekki er auðvelt að koma í veg fyrir eða hundsa. Ekki skal vera mögulegt að slökkva á kerfinu fyrr en búið er að fylla á hvarfmiðilinn.

3.3. Viðvörunarljósabúnaðurinn skal sýna skilaboð sem gefa til kynna lítið magn hvarfmiðils. Viðvörunin skal ekki vera sú sama og notuð er vegna innbyggðra greiningarkerfisins eða annars viðhalds á hreyfli. Viðvörunin skal vera nægilega skýr þannig að ökumaðurinn átti sig á að magn hvarfmiðilsins er orðið lítið (t.d. „þvagefni vantar,“ „AdBlue vantar“ eða „hvarfmiðil vantar“).

3.4. Viðvörunarkerfið þarf ekki að vera stöðugt virkt í upphafi, en þó skal viðvörunin stigmagnast þannig að hún verði samfelld þegar magn hvarfmiðilsins nálgast þá stöðu þegar þvingunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í 8. lið, verður virkt. Birta skal skýra viðvörun (t.d. „bætið á þvagefni,“ „bætið á AdBlue“ eða „bætið á hvarfmiðil“). Samfellt viðvörunarkerfi má rjúfa tímabundið með öðrum viðvörunarmerkjum að því tilskildu að þau veiti mikilvægar öryggistengdar upplýsingar.

3.5. Viðvörunarkerfið skal virkjast við vegalengd sem nemur a.m.k. 2400 km af drægni áður en hvarfmiðilsgeymirinn tæmist eða, að vali framleiðandans, eigi síðar en þegar hvarfmiðill í geyminum nær einu eftirfarandi magni:

a) Magn sem búist er við að nægi til að keyra 150% af meðaldrægni með fullan eldsneytisgeymi eða

b) magn sem er 10% af rúmtaki hvarfmiðilsgeymisins,

hvort sem á sér stað fyrr.

4. Greining á röngum hvarfmiðli

4.1. Í ökutækinu skal vera búnaður til að ákvarða hvort hvarfmiðill, sem samsvarar eiginleikum sem framleiðandinn tilgreinir og skráðir eru í 3. viðbæti við I. viðauka, sé til staðar í ökutækinu.

4.2. Ef hvarfmiðillinn í geymslutankinum samsvarar ekki lágmarkskröfum sem framleiðandinn setur fram skal viðvörunarkerfi ökumanns, sem getið er um í 3. lið, verða virkt og birta tilkynningu með viðeigandi viðvörun (t.d. „rangt þvagefni greinist," „rangt AdBlue greinist" eða „rangur hvarfmiðill greinist"). Ef gæði hvarfmiðilsins eru ekki leiðrétt innan 50 km frá því að viðvörunarkerfið verður virkt skulu kröfurnar um þvingunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í 8. lið, gilda.

5. Vöktun á notkun hvarfmiðils

5.1. Í ökutækinu skal vera búnaður til að ákvarða notkun hvarfmiðils og veita aðgang að notkunarupplýsingum utan ökutækisins.

5.2. Meðalnotkun hvarfmiðils og meðaltal umbeðinnar notkunar hvarfmiðils í öllu hreyfilkerfinu skulu vera tiltæk um raðtengi staðlaða greiningartengisins. Gögn um undangengið tímabil þar sem lokið er 2400 km notkun ökutækisins skulu vera tiltæk.

5.3. Í því skyni að vakta notkun á hvarfmiðli skal a.m.k. vakta eftirfarandi mæliþætti í ökutækinu:

a) Magn hvarfmiðilsins í geyminum í ökutækinu og

b) flæði hvarfmiðils eða innsprautun hvarfmiðils eins nálægt innsprautunarstað í eftirmeðferðarkerfi fyrir útblástur og tæknilega er mögulegt.

5.4. Frávik sem er meira en 50% á milli meðalnotkunar hvarfmiðils og meðaltals umbeðinnar notkunar hvarfmiðils í hreyfilkerfinu á 30 mínútna notkunartíma ökutækisins skal virkja viðvörunarkerfi ökumanns, sem getið er um í 3. lið, og birta tilkynningu með viðeigandi viðvörun (t.d. „bilun í skömmtun þvagefnis," „bilun í skömmtun AdBlue" eða „bilun í skömmtun hvarfmiðils"). Ef ekkert er gert varðandi notkun hvarfmiðilsins innan 50 km frá því að viðvörunarkerfið verður virkt skulu kröfurnar um þvingunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í 8. lið, gilda.

5.5. Ef rof verður á skömmtun á hvarfmiðlinum skal viðvörunarkerfi ökumanns, sem getið er um í 3. lið, verða virkt og birta skilaboð með viðeigandi viðvörun. Sleppa má að virkja viðvörunarkerfi fyrir ökumann eins um getur í 3. lið ef skömmtun hvarfmiðils er rofin af hreyfilkerfinu vegna þess að notkunarskilyrði ökutækisins eru þannig að skömmtunar hvarfmiðils er ekki krafist fyrir mengunarvarnargetu ökutækisins, að því tilskildu að framleiðandinn hafi tilkynnt viðurkenningaryfirvöldum með skýrum hætti um það hvenær slík notkunarskilyrði eigi við. Ef skömmtun hvarfmiðilsins er ekki leiðrétt innan 50 km frá því að viðvörunarkerfið verður virkt skulu kröfurnar um þvingunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í 8. lið, gilda.

6. Vöktun á NO_x-losun

6.1. Í stað krafnanna um vöktun, sem um getur í 4. og 5. lið, mega framleiðendur mæla umframmagn köfnunarefnisoxíða í útblástursröri beint með skynjurum útblásturslofts.

6.2. Framleiðandinn skal sýna fram á að notkun þeirra skynjara sem um getur í lið 6.1 hér á undan og annarra skynjara ökutækisins valdi því að viðvörunarkerfið fyrir ökumann, sem um getur í 3. lið hér á undan, verði virkt, að birt séu skilaboð með viðeigandi viðvörun (t.d. „losun of mikil — athugið þvagefni," „losun of mikil — athugið AdBlue," „losun of mikil — athugið hvarfmiðil") og að þvingunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í lið 8.3, verði virkt þegar aðstæðurnar sem vísað er til í liðum 4.2, 5.4 eða 5.5 koma upp.

Að því er varðar þennan lið telst þetta ástand hafa komið upp ef farið er yfir viðeigandi viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins fyrir köfnunarefnisoxíð í töflunum sem settar eru fram í lið 2.3 í XI. viðauka.

Losun köfnunarefnisoxíða meðan á prófun stendur í því skyni að sýna fram á að farið sé að þessum kröfum skal ekki vera meiri en 20% umfram viðmiðunargildi innbyggða greiningarkerfisins.

7. Geymsla upplýsinga um bilanir

7.1. Þegar vísað er í þennan lið skal vista óafmáanlegt auðkenni mæliþátta (PID), sem auðkennir ástæðuna fyrir því að þvingunarkerfið verður virkt og vegalengdina sem ökutækinu er ekið á meðan kerfið er virkt. Ökutækið skal geyma

PID-færslur í a.m.k. 800 daga eða 30 000 km akstur ökutækisins. PID-færslan skal gerð tiltæk gegnum raðtengi staðlaða greiningartengisins þegar beiðni er send úr almennu skönnunartæki í samræmi við ákvæði liðar 2.3 í 1. viðbæti við XI. viðauka. Upplýsingarnar sem vistaðar eru í PID skulu vera tengdar við það tímabil uppsafnaðrar notkunar ökutækis sem þær verða til á, með nákvæmni sem er ekki minni en 300 dagar eða 10 000 km.

7.2. Bilanir í skömmtunarkerfi hvarfmiðilsins sem rekja má til bilunar í tæknibúnaði (t.d. vélrænna eða rafrænna bilana) falla einnig undir kröfur um innbyggð greiningarkerfi í XI. viðauka.

8. Þvingunarkerfi fyrir ökumann

8.1. Ökutækið skal búið þvingunarkerfi fyrir ökumann sem tryggir að ökutækinu sé ávallt ekið með virkum mengunarvarnarbúnaði. Þvingunarkerfið skal hannað þannig að það tryggi að ekki sé hægt að aka ökutækinu með tómum geymi fyrir hvarfmiðil.

8.2. Þvingunarkerfið skal virkjast eigi síðar en þegar magn hvarfmiðils í geyminum nær einhverju af eftirfarandi:

a) Ef viðvörunarkerfið virkjaðist a.m.k. 2400 km áður en búist var við að hvarfmiðilsgeymirinn tæmdist, magn sem dugir til að keyra meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi.

b) Ef viðvörunarkerfið virkjaðist við það magn sem tilgreint er í a-lið liðar 3.5, magn sem dugir til að keyra 75% af meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi eða

c) ef viðvörunarkerfið virkjaðist við það magn sem tilgreint er í b-lið liðar 3.5., við 5% af rúmtaki hvarfmiðilsgeymisins.

d) Ef viðvörunarkerfið virkjaðist áður en magninu var náð sem lýst er í bæði a- og b-lið liðar 3.5 en minna en 2400 km er eftir af vegalengd áður en hvarfmiðilsgeymirinn tæmist, magnið sem lýst er í b- eða c-lið í þessum lið, hvort sem gerist fyrr.

Ef notaður er valkosturinn sem lýst er í lið 6.1 skal viðvörunarkerfið virkjast þegar upp koma frávikin sem lýst er í 4. eða 5. lið eða losunargildi köfnunarefnisoxíða sem er lýst í lið 6.2.

Ef greiningin er sú að geymir fyrir hvarfmiðil sé tómur eða í ljós koma þau frávik sem getið er í 4., 5. eða 6. lið ganga í gildi kröfurnar í 7. lið um geymslu upplýsinga um bilanir.

8.3. Framleiðandinn velur hvers konar þvingunarkerfi fyrir ökumann er sett upp. Valkostum fyrir kerfi er lýst í liðum 8.3.1, 8.3.2, 8.3.3 og 8.3.4.

8.3.1. Aðferðin „engin ræsing hreyfils eftir niðurtalningu“ (e. *no engine restart after countdown*) gerir kleift að telja niður endurræsingar eða vegalengd eftir að þvingunarkerfið verður virkt. Ræsingar hreyfils, sem stjórnað er af stjórnbúnaði ökutækisins, eins og t.d. stöðvunar-/ræsingarkerfi, eru ekki taldar með í þessari niðurtalningu.

8.3.1.1. Ef viðvörunarkerfið virkjaðist a.m.k. 2400 km áður en búist var við að hvarfmiðilsgeymirinn tæmdist eða ef upp komu frávikin sem lýst er í 4. eða 5. lið eða losunargildi köfnunarefnisoxíða er eins og því er lýst í lið 6.2 skal koma í veg að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.1.2. Ef þvingunarkerfið virkjaðist við það magn sem tilgreint er í b-lið liðar 8.2 skal koma í veg að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir 75% af meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.1.3. Ef þvingunarkerfið virkjaðist við það magn sem lýst er í c-lið liðar 8.2 skal komið í veg fyrir að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir meðaldrægni ökutækisins með 5% af rúmtaki hvarfmiðilsgeymisins, frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.1.4. Einnig ber að koma í veg fyrir að hreyfill sé endurræstur um leið og hvarfmiðilsgeymirinn tæmist ef slíkt skyldi eiga sér stað á undan þeim aðstæðum sem tilgreindar eru í liðum 8.3.1.1, 8.3.1.2 eða 8.3.1.3.

8.3.2. Kerfið „engin ræsing eftir eldsneytisáfyllingu“ (e. *no start after refuelling*) kemur í veg fyrir að hægt sé að ræsa ökutækið eftir áfyllingu ef þvingunarkerfið er virkt.

8.3.3. Aðferðin „læsing eldsneytisáfyllingar“ (e. *fuel-lockout*) kemur í veg fyrir að hægt sé að setja eldsneyti á ökutækið með því að læsa eldsneytisáfyllingarstút eftir að þvingunarkerfið er orðið virkt. Læsingarkerfið skal vera nægilega harðgert til að koma í veg fyrir að átt sé við það.

8.3.4. Aðferðin „takmörkun afkasta“ (e. *performance restriction*) takmarkar hraða ökutækisins eftir að þvingunarkerfið er orðið virkt. Hraðatakmörkunin skal vera þannig að ökumaðurinn greini hana og skal hún draga verulega úr hámarkshraða ökutækisins. Slík takmörkun skal fara í gang smám saman eða við ræsingu hreyfils. Skömmu áður en komið er í veg fyrir endurræsingu hreyfils skal hraði ökutækisins ekki fara yfir 50 km/klst.

8.3.4.1. Ef viðvörunarkerfið virkjaðist a.m.k. 2400 km áður en búist var við að hvarfmiðilsgeymirinn tæmdist eða ef upp koma frávikin sem lýst er í 4. eða 5. lið eða losunargildi köfnunarefnisoxíða er eins og því er lýst í lið 6.2 skal koma í veg að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.4.2. Ef þvingunarkerfið virkjaðist við það magn sem tilgreint er í b-lið liðar 8.2 skal koma í veg að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir 75% af meðaldrægni ökutækisins með fullan eldsneytisgeymi frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.4.3. Ef þvingunarkerfið virkjaðist við það magn sem lýst er í c-lið liðar 8.2 skal komið í veg fyrir að hreyfill sé endurræstur um leið og ökutækið hefur verið keyrt þá vegalengd sem búist er við að dugi fyrir meðaldrægni ökutækisins með 5% af rúmtaki hvarfmiðilsgeymisins, frá því að þvingunarkerfið virkjaðist.

8.3.4.4. Einnig ber að koma í veg fyrir að hreyfill sé endurræstur um leið og hvarfmiðilsgeymirinn tæmist ef slíkt skyldi eiga sér stað á undan þeim aðstæðum sem tilgreindar eru í liðum 8.3.4.1, 8.3.4.2 eða 8.3.4.3.

8.4. Þegar þvingunarkerfið hefur komið í veg fyrir endurræsingu hreyfils skal einungis slökkna á því ef þau frávik sem tilgreind eru í 4., 5. eða 6. lið hafa verið leiðrétt eða ef magnið af viðbættum hvarfmiðli uppfyllir eina af eftirfarandi viðmiðunum:

a) Búist er við magnið nægi til að keyra 150% af meðaldrægni með fullan eldsneytisgeymi eða

b) magnið er a.m.k. 10% af rúmtaki hvarfmiðilsgeymisins.

Eftir að búið er að framkvæma viðgerð til að lagfæra bilun þar sem innbyggða greiningarkerfið hefur verið virkjað samkvæmt lið 7.2 má endurvirkja þvingunarkerfið í gegnum raðtengi innbyggða greiningarkerfisins (t.d. með stöðluðu skönnunartæki) til að gera kleift að endurræsa ökutækið vegna sjálfsgreiningar. Ekki má aka ökutækinu meira en 50 km til að hægt sé að staðfesta hvort viðgerð hafi tekist. Þvingunarkerfið skal endurvirkjað að öllu leyti ef bilunin er enn til staðar eftir þessa staðfestingu.

8.5. Viðvörunarkerfi fyrir ökumann, sem um getur í 3. lið, skal birta skilaboð sem gefa skýrt til kynna:

a) Fjölda endurræsinga sem eftir eru og/eða vegalengd sem eftir er og

b) þau skilyrði sem leyfa endurræsingu ökutækisins.

8.6. Þvingunarkerfi fyrir ökumann skal gert óvirkt þegar skilyrðin fyrir virkjun þess eru ekki lengur til staðar. Ekki skal slokkna sjálfkrafa á þvingunarkerfi fyrir ökumann nema ástæðan fyrir virkjun þess hafi verið lagfærð.

8.7. Við gerðarviðurkenningu skal afhenda gerðarviðurkenningaryfirvaldinu ítarlegar skriflegar upplýsingar sem lýsa öllum starfrænum eiginleikum þvingunarkerfisins fyrir ökumann.

8.8. Í tengslum við umsókn um gerðarviðurkenningu samkvæmt þessari reglugerð skal framleiðandi sýna fram á virkni viðvörunarkerfis og þvingunarkerfis fyrir ökumann.

9. Kröfur um upplýsingar

9.1. Framleiðandinn skal láta öllum eigendum nýrra ökutækja í té skýrar skriflegar upplýsingar um mengunarvarnarkerfið. Í upplýsingunum skal koma fram að ef mengunarvarnarkerfi ökutækisins starfar ekki rétt eigi ökumaðurinn að fá upplýsingar um vandamál frá viðvörunarkerfinu fyrir ökumann og að þvingunarkerfi fyrir ökumann komi í framhaldi af því í veg fyrir að hægt sé að ræsa ökutækið.

9.2. Í leiðbeiningunum skal gefa til kynna kröfur um rétta notkun og viðhald ökutækja, þ.m.t. rétta notkun hvarfmiðla sem eru sjálfbrotnandi.

9.3. Í leiðbeiningunum skal tilgreint hvort ökumaður ökutækisins þurfi að fylla á hvarfmiðla sem eru sjálfbrotnandi á milli venjulegra viðhaldstímabila. Þær skulu gefa til kynna hvernig ökumaðurinn ökutækisins eigi að fylla á geyminn fyrir hvarfmiðilinn. Upplýsingarnar skulu einnig gefa til kynna líklega notkun hvarfmiðils fyrir viðkomandi gerð ökutækis og hversu oft ætti að fylla á.

9.4. Í leiðbeiningunum skal tilgreint að notkun og áfylling tilskilins hvarfmiðils með réttri forskrift sé skyldubundin svo ökutækið samræmist samræmisvottorði sem gefið er út fyrir þá gerð ökutækis.

9.5. Í leiðbeiningunum skal koma fram að það geti verið refsiverður verknaður að nota ökutæki sem notar ekki hvarfmiðil ef þess er krafist vegna minnkunar á losun.

9.6. Í leiðbeiningunum skal útskýra hvernig viðvörunarkerfi og þvingunarkerfi fyrir ökumann virka. Afleiðingar þess að hundsa viðvörunarkerfið og fylla ekki á hvarfmiðilinn skulu auk þess útskýrðar.

10. Rekstrarskilyrði eftirmeðferðarkerfis

Framleiðendur skulu tryggja að mengunarvarnarkerfið haldi mengunarvarnarvirkni sinni við öll umhverfisskilyrði, einkum við lágan umhverfishita. Þetta felur í sér ráðstafanir til að koma í veg fyrir að hvarfmiðillinn frjósi alveg þegar lagt er í allt að 7 daga við 258 K (–15 °C) með hvarfmiðilsgeymi sem er 50% fullur. Hafi hvarfmiðillinn frosið skal framleiðandinn tryggja að hvarfmiðillinn sé fljótandi og tilbúinn til notkunar innan 20 mínútna frá ræsingu ökutækisins við 258 K (–15 °C) mælt inni í hvarfmiðilsgeyminum.“

———

IX. VIÐAUKI

Ákvæðum XXI. viðauka við reglugerð (ESB) 2017/1151 er breytt sem hér segir:

1) Eftirfarandi liðir 3.1.16, 3.1.17 og 3.1.18 bætast við á undan mynd 1:

„3.1.16. „Svörunartími“: tíminn sem líður frá breytingu á efnisþættinum sem mæla skal við viðmiðunarpunktinn og kerfissvörunar sem er 90% af endanlegri aflestrartölu (t90) með sýnatökunemann skilgreindan sem viðmiðunarpunkt, þar sem breytingin á mælda efnisþættinum er minnst 60% af fullu kvarðaútslagi og tekur innan við 0,1 sekúndu. Svörunartími kerfisins skiptist í seinkunartíma kerfisins og ristíma kerfisins.

3.1.17. „Seinkunartími“: tímamunurinn á milli breytingar á efnisþættinum sem mæla skal við viðmiðunarpunktinn og kerfissvörunar sem er 10% af endanlegri aflestrartölu (t10) með sýnatökunemann skilgreindan sem viðmiðunarpunkt. Þegar um er að ræða loftkennda efnisþætti er þetta ferðatími mælda efnisþáttarins frá sýnatökunemanum til nemans.

3.1.18. „Ristími“: munurinn á tímanum á milli 10% og 90% svörunar af endanlegri aflestrartölu (t90 – t10).“

2) Í stað liðar 3.2.21 kemur eftirfarandi:

„3.2.21. „Fríhjólunarhamur ökutækis“: notkunarkerfi sem gerir mögulega nákvæma og endurtakanlega ákvörðun á ökumótstöðu og nákvæma aflmælisstillingu.“

3) Eftirfarandi liðir 3.2.28 til 3.2.35 bætast við:

„3.2.28. „Hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis“: snúningshraði hreyfils deilt með hraða ökutækis í tilteknum gír.

3.2.29. „Vegkefli með einu kefli“: vegkefli þar sem hvert hjól á ási ökutækis er í snertingu við eitt kefli.

3.2.30. „Vegkefli með tveimur keflum“: vegkefli þar sem hvert hjól á ási ökutækis er í snertingu við tvö kefli.

3.2.31. „Aflás“: ás ökutækis sem getur skilað knúningsorku og/eða endurheimt orku óháð því hvort að slíkt sé hægt einungis tímabundið eða varanlega og/eða er valkvæður notkunarhamur.

3.2.32. „Vegkefli fyrir tvíhjóladrif“: vegkefli þar sem einungis hjólin á einum ás ökutækis er í snertingu við keflið eða keflin.

3.2.33. „Vegkefli fyrir fjórhjóladrif": vegkefli þar sem öll hjólin á báðum ásum ökutækis eru í snertingu við keflin.

3.2.34. „Vegkefli í tvíhjóladrifsham“: vegkefli fyrir tvíhjóladrif eða vegkefli fyrir fjórhjóladrif sem einungis líkir eftir tregðu og ökumótstöðu á aflási prófunarökutækis á meðan hjólin á þeim ási sem er án afls hafa ekki áhrif á útkomu mælingarinnar, óháð því hvort þau snúast eða snúast ekki.

3.2.35. „Vegkefli í fjórhjóladrifsham“: vegkefli fyrir fjórhjóladrif sem líkir eftir tregðu og ökumótstöðu á báðum ásum prófunarökutækis.“

4) Í stað liðar 3.3 kemur eftirfarandi:

„3.3. Hrein rafökutæki, tvinnrafökutæki, ökutæki með efnarafala og tvíeldsneytisökutæki“.

5) Eftirfarandi liðir bætast við:

„3.3.21. „Tvíeldsneytisökutæki“: ökutæki sem er með tveimur aðskildum eldsneytisgeymslukerfum og er hannað til að ganga fyrir annarri eldsneytistegundinni í einu; þó er heimilt að nota samtímis báðar eldsneytistegundir í takmörkuðu magni og í takmarkaðan tíma.

3.3.22. „Tvíeldsneytisökutæki, knúið gasi“ (e. *bi-fuel gas vehicle*): tvíeldsneytisökutæki þar sem eldsneytistegundirnar tvær eru bensín (bensínhamur) og ýmist fljótandi jarðolíugas, jarðgas/lífmetan eða vetni.“

6) Í stað liðar 3.5.9 kemur eftirfarandi:

„3.5.9. „Aðalhamur“: merkir, að því er varðar þennan viðauka, einn valkvæðan notkunarham sem er alltaf valinn þegar ökutækið er ræst, óháð því hvaða valkvæði notkunarhamur var virkur síðast þegar ökutækið var stöðvað og sem ekki er hægt að endurstilla sem annan ham. Einungis er hægt að skipta úr aðalhaminum í annan, valkvæðan, notkunarham af ásetningi ökumannsins eftir að ökutækið hefur verið ræst.“

7) Í stað liðar 3.5.11 kemur eftirfarandi:

„3.5.11. „Losun með útblæstri“: losun loftkenndra, fastra og fljótandi efnasambanda í gegnum útblástursrör.“

8) Í stað liðar 3.7.1 kemur eftirfarandi:

„3.7.1. „*Málafl hreyfils*“ (P_{rated}): hámarksnettóafl hreyfilsins eða vélarinnar í kW samkvæmt kröfunum í XX. viðauka.“

9) Í stað liðar 3.8.1 kemur eftirfarandi:

„3.8.1. „Kerfi sem endurnýjar sig reglubundið“: mengunarvarnarbúnaður fyrir útblástur (t.d. hvarfakútur, agnasía) sem krefst þess að reglubundið endurnýjunarferli eigi sér stað.“

10) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á lið 4.1:

a) Í stað línanna fyrir styttingarnar „hæsti $fasi_2$“ og „hæsti $fasi_3$“ kemur eftirfarandi:

„Hæsti $fasi_2$ WLTC-prófunarlota í flokki 2, hæsti hraðafasi

Hæsti $fasi_3$ WLTC-prófunarlota í flokki 3, hæsti hraðafasi“.

b) Í stað línanna fyrir styttingarnar „$háfasi_2$“, "$háhraði_{3-1}$“ og „$háhraði_{3-2}$“ kemur eftirfarandi:

„$Háfasi_2$ WLTC-prófunarlota í flokki 2, háhraðafasi

$Háfasi_{3a}$ WLTC-prófunarlota í flokki 3a, háhraðafasi

$Háfasi_{3b}$ WLTC-prófunarlota í flokki 3b, háhraðafasi“.

c) Í stað línanna fyrir styttingarnar „$lágfasi_1$“, „$lágfasi_2$“, „$lágfasi_3$“, „$miðfasi_1$“, „$miðfasi_2$“, „$miðfasi_{3-1}$“ og „$miðfasi_{3-2}$“ kemur eftirfarandi:

„$Lágfasi_1$ WLTC-prófunarlota í flokki 1, lághraðafasi

$Lágfasi_2$ WLTC-prófunarlota í flokki 2, lághraðafasi

$Lágfasi_3$ WLTC-prófunarlota í flokki 3, lághraðafasi

$Miðfasi_1$ WLTC-prófunarlota í flokki 1, miðhraðafasi

$Miðfasi_2$ WLTC-prófunarlota í flokki 2, miðhraðafasi

$Miðfasi_{3a}$ WLTC-prófunarlota í flokki 3a, miðhraðafasi

$Miðfasi_{3b}$ WLTC-prófunarlota í flokki 3b, miðhraðafasi“

d) Eftirfarandi lína kemur á eftir línunni með skammstöfuninni „REESS“:

„RRC Veltiviðnámsstuðull“.

11) Í stað liðar 5.0 kemur eftirfarandi:

„5.0. Úthluta skal öllum ökutækjahópum, sem skilgreindir eru í lið 5.6 til 5.9, sérstöku kennimerki með eftirfarandi sniði:

FT-nnnnnnnnnnnnnnn-WMI-x

Þar sem:

FT er kennimerki fyrir gerð hópsins:

— IP = Brúunarhópur eins og hann er skilgreindur í lið 5.6.

— RL = Ökumótstöðuhópur eins og hann er skilgreindur í lið 5.7.

— RM = Ökumótstöðufylkjahópur eins og hann er skilgreindur í lið 5.8.

— PR = Hópur kerfa sem endurnýja sig reglubundið (K_i) eins og skilgreint er í lið 5.9.

— AT = Prófunarhópur með leiðréttingu á umhverfishita (ATCT) eins og skilgreint er í 2. lið 6. undirviðauka a.

nnnnnnnnnnnnnnn er rittáknastrengur með mest fimmtán rittáknum sem takmarkast við 0-9, A-Z og undirstrik „_“.

WMI (auðkenni framleiðanda á heimsvísu) er kóði sem auðkennir framleiðanda á einkvæman hátt sem er skilgreindur í ISO-staðli 3780:2009.

Fastsetja skal x við „1“ eða „0“ í samræmi við eftirfarandi ákvæði:

a) Í samkomulagi við viðurkenningaryfirvaldið og eigandann að WMI-kóðanum skal fastsetja númerið við „1“ ef ökutækjahópur er skilgreindur í þeim tilgangi að ná yfir ökutæki frá:

i. Stökum framleiðanda með einn stakan WMI-kóða,

ii. framleiðanda með marga WMI-kóða en einungis í tilvikum þar sem nota á einn WMI-kóða,

iii. fleiri en einum framleiðanda en einungis í tilvikum þar sem nota á einn WMI-kóða.

Ef um er að ræða það sem fram kemur í i., ii. og iii. lið skal auðkenniskóði hópsins samanstanda af einum einkvæmum streng með n-rittáknum og einum einkvæmum WMI-kóða og þar á eftir tölustafnum 1.

b) Í samkomulagi við viðurkenningaryfirvaldið skal númerið stillt á 0 ef ökutækjahópur er skilgreindur samkvæmt sömu viðmiðunum og samsvarandi ökutækjahópur sem skilgreindur er í samræmi við a-lið en framleiðandinn velur að nota annan WMI-kóða. Í því tilviki skal auðkenniskóði hópsins samanstanda af sama streng n-rittákna sem ákvarðaður er fyrir ökutækjahópinn sem skilgreindur er í samræmi við a-lið ásamt einkvæmum WMI-kóða sem skal vera ólíkur öllum þeim WMI-kóðum sem notaðir eru í tilviki a-liðar, og þar á eftir tölustafnum 0.“

12) Í lið 5.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Í þessu skal felast að hosur, samskeyti og tengingar, sem notuð eru í mengunarvarnarkerfinu, séu örugg.“

13) Liður 5.1.1. fellur brott,

14) Í stað liðar 5.3.6 kemur eftirfarandi:

„5.6. Þeir hjólbarðar sem notaðir eru fyrir losunarprófun skulu vera í samræmi við skilgreininguna í lið 2.4.5 í 6. undirviðauka við þennan viðauka.“

15) Í stað liðar 5.5 kemur eftirfarandi:

„5.5. Ákvæði um öryggi rafeindakerfisins

Ákvæði um öryggi rafeindakerfisins skulu vera þau sem tilgreind eru í lið 2.3 í I. viðauka.“

16) Liðir 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3 og 5.5.4 falla brott.

17) Í stað liðar 5.6.1 kemur eftirfarandi:

„5.6.1. Brúunarhópur fyrir hrein brunahreyfilsökutæki“.

18) Eftirfarandi liðir 5.6.1.1, 5.6.1.2 og 5.6.1.3 bætast við:

„5.6.1.1. Ökutæki geta tilheyrt sama brúunarhópnum í öllum eftirfarandi tilvikum, þ.m.t. samsetningum af þessum tilvikum:

a) Þau tilheyra mismunandi ökutækjaflokkum eins og lýst er í 2. lið 1. undirviðauka,

b) þau hafa mismunandi gildi fyrir niðurskölun eins og lýst er í 8. lið 1. undirviðauka,

c) þau hafa mismunandi takmörkun á hraða eins og lýst er Í 9. lið 1. undirviðauka.

5.6.1.2. Einungis ökutæki sem eru eins að því er varðar eftirfarandi eiginleika ökutækis/aflrásar/gírskiptingar geta verið hluti af sama brúunarhópi:

a) Gerð brunahreyfils: tegund eldsneytis (eða tegundir ef um er að ræða ökutæki knúin fjölblöndueldsneyti eða tvíeldsneytisökutæki), brennsluferli, slagrými hreyfils, eiginleikar við fullt álag, hreyfiltækni og hleðslukerfi og einnig önnur undirkerfi eða eiginleikar hreyfils sem hafa umtalsverð áhrif á massalosun koltvísýrings við WLTP-skilyrði,

b) vinnslumáti allra íhluta í aflrásinni sem áhrif hafa á massalosun koltvísýrings,

c) gerð gírskiptingar (t.d. beinskipting, sjálfskipting eða samfelld, stiglaus skipting) og tegund gírskiptingar (t.d. málgildi snúningsvægis, fjöldi gíra, fjöldi tengsla, o.s.frv.),

d) hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis (snúningshraði hreyfils deilt með hraða ökutækis). Þessari kröfu telst fullnægt ef mismunurinn með tilliti til hlutfalla snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis milli algengustu gerða gírskiptinga sem settar eru upp, er innan við 8% fyrir öll hlutaðeigandi yfirfærsluhlutföll,

e) fjöldi aflása,

f) ATCT-hópur samkvæmt viðmiðunareldsneyti ef um er að ræða ökutæki knúin fjölblöndueldsneyti eða tvíeldsneytisökutæki,

g) fjöldi hjóla á hverjum ás.

5.6.1.3. Ef notaður er annar mæliþáttur, eins og hærra n_{min_drive}, eins og skilgreint er í k-lið 2. liðar 2. undirviðauka, eða ASM, eins og skilgreint er í lið 3.4 í 2. undirviðauka, skal þessi mæliþáttur vera sá sami innan brúunarhóps.“

19) Í stað c-liðar í lið 5.6.2 kemur eftirfarandi:

„c) gerð raforkubreytis á milli rafvélar og endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi, á milli endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi og lágspennuaflgjafa og á milli tengis fyrir endurhleðslu og endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi, og aðrir eiginleikar sem hafa umtalsverð áhrif á massalosun koltvísýrings og raforkunotkun við WLTP-skilyrði,“.

20) Í stað e-liðar í lið 5.6.3 kemur eftirfarandi:

„e) gerð raforkubreytis á milli rafvélar og endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi, á milli endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi og lágspennuaflgjafa og á milli tengis fyrir endurhleðslu og endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis með drifrafgeymi, og aðrir eiginleikar sem hafa umtalsverð áhrif á raforkunotkun og drægni við WLTP-skilyrði,“.

21) Í stað g-liðar í lið 5.6.3 kemur eftirfarandi:

„g) hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis (snúningshraði hreyfils deilt með hraða ökutækis). Þessari kröfu telst fullnægt ef mismunurinn með tilliti til hlutfalla snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis milli algengustu gerða gírskiptinga sem settar eru upp, er innan við 8% fyrir öll hlutaðeigandi yfirfærsluhlutföll.“

22) Í stað d-liðar í lið 5.7 og til loka þess liðar kemur eftirfarandi:

„d) fjöldi hjóla á hverjum ás.

Ef a.m.k. ein rafvél er tengd þegar gírkassi er í hlutlausri stöðu og ökutækið er ekki búið fríhjólunarham ökutækis (liður 4.2.1.8.5 í 4. undirviðauka) þannig að rafvélin hafi engin áhrif á ökumótstöðu, skulu viðmiðanirnar úr a-lið liðar 5.6.2 og a-lið liðar 5.6.3 gilda.

Komi mismunur í ljós, annar en massi ökutækis, snúningsmótstaða og loftaflfræði, sem hefur umtalsverð áhrif á ökumótstöðu, skal það ökutæki ekki teljast hluti af hópnum nema með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins.“

23) Í stað liðar 5.8 kemur eftirfarandi:

„5.8. Ökumótstöðufylkjahópur

Ökumótstöðufylkjahópinn má nota fyrir ökutæki sem eru hönnuð fyrir tæknilega leyfilegan hámarksmassa með hleðslu sem er ≥ 3 000 kg.

Ökumótstöðufylkjahópinn má einnig nota fyrir ökutæki sem lögð eru fram til fjölþrepa gerðarviðurkenningar eða fjölþrepa ökutæki sem lögð eru fram til skráningarviðurkenningar ökutækis.

Ákvæðin sem sett eru fram í 2. lið XII. viðauka skulu gilda í þessum tilvikum.

Einungis ökutæki, sem eru eins að því er varðar eftirfarandi eiginleika, geta verið hluti af sama ökumótstöðu-fylkjahópi:

a) Gerð gírskiptingar (t.d. beinskipting, sjálfskipting eða annað),

b) fjöldi aflása,

c) fjöldi hjóla á hverjum ás.“

24) Í stað liðar 5.9 kemur eftirfarandi:

„5.9. Hópur kerfa sem endurnýja sig reglubundið (K_i)

Einungis ökutæki sem eru eins að því er varðar eftirfarandi eiginleika geta verið hluti af sama hópi kerfa sem endurnýja sig reglubundið:

a) Gerð brunahreyfils: eldsneytisgerð, brennsluferli,

b) kerfi sem endurnýjar sig reglubundið (þ.e. hvati, agnasía),

i. hönnun (þ.e. tegund umlykju, tegund eðalmálms, tegund hvarfefnis, þéttleiki hólfa),

ii. gerð og vinnsluháttur,

iii. rúmmál ±10%,

iv. staðsetning (hitastig ±100 °C við næst hæsta viðmiðunarsnúningshraða).

c) Prófunarmassi sérhvers ökutækis í hópnum skal vera minni en eða jafn og prófunarmassi ökutækisins sem notað er við K_i -sýniprófið plús 250 kg.“

25) Liðir 5.9.1 og 5.9.2 falla brott.

26) Í stað liðar 6.1 kemur eftirfarandi:

„6.1. Viðmiðunarmörk

Viðmiðunarmörk fyrir losun skulu vera þau sem tilgreind eru í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.“

27) Ákvæðum 1. undirviðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað 1. liðar til liðar 3.5 kemur eftirfarandi:

„1. Almennar kröfur

Lotan, sem aka skal, veltur á hlutfallinu milli málafls og massa prófunarökutækis, sem er tilbúið til aksturs, að frádregnum 75 kg, W/kg, og hámarkshraða þess, v_{max}.

Í öðrum hlutum viðaukans skal vísa til lotunnar sem fæst með beitingu krafnanna í þessum undirviðauka sem „viðeigandi lotu“.“

2. Ökutækjaflokkun

2.1. Ökutæki í flokki 1 hafa hlutfall afls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs, að frádregnum 75 kg, sem er $P_{mr} \leq 22$ W/kg.

2.2. Ökutæki í flokki 2 hafa hlutfall afls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs, að frádregnum 75 kg, sem er > 22 en ≤ 34 W/kg.

2.3. Ökutæki í flokki 3 hafa hlutfall afls á móti massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs, að frádregnum 75 kg, sem er > 34 W/kg.

2.3.1. Ökutækjum í flokki 3 er skipt í tvo undirflokka í samræmi við hámarkshraða þeirra, v_{max}.

2.3.1.1. Ökutæki í flokki 3a með $v_{max} < 120$ km/klst.

2.3.1.2. Ökutæki í flokki 3b með $v_{max} \geq 120$ km/klst.

2.3.2. Öll ökutæki, sem prófuð eru í samræmi við 8. undirviðauka, skulu teljast ökutæki í flokki 3.

3. Prófunarlotur

3.1. Lota í flokki 1

3.1.1. Heil lota í flokki 1 skal samanstanda af lághraðafasa ($lágfasi_1$), miðhraðafasa ($miðfasi_1$) og lághraðafasa til viðbótar ($lágfasi_1$).

3.1.2. Fasanum $lágfasi_1$ er lýst á mynd A1/1 og í töflu A1/1.

3.1.3. Fasanum $miðfasi_1$ er lýst á mynd A1/2 og í töflu A1/2.

3.2. Lota í flokki 2

3.2.1. Heil lota í flokki 2 skal samanstanda af lághraðafasa (lágfasi$_2$), miðhraðafasa (miðfasi$_2$), háhraðafasa (háfasi$_2$) og hæsta hraðafasa (hæsti fasi$_2$).

3.2.2. Fasanum lágfasi$_2$ er lýst á mynd A1/3 og í töflu A1/3.

3.2.3. Fasanum miðfasi$_2$ er lýst á mynd A1/4 og í töflu A1/4.

3.2.4. Fasanum háfasi$_2$ er lýst á mynd A1/5 og í töflu A1/5.

3.2.5. Fasanum hæsti fasi$_2$ er lýst á mynd A1/6 og í töflu A1/6.

3.3. Lota í flokki 3

Lotum í flokki 3 er skipt í tvo undirflokka til að endurspegla undirflokkana fyrir ökutæki í flokki 3.

3.3.1. Lota í flokki 3a

3.3.1.1. Heil lota skal samanstanda af lághraðafasa (lágfasi$_3$), miðhraðafasa (miðfasi$_{3a}$), háhraðafasa (háfasi$_{3a}$) og hæsta hraðafasa (hæsti fasi$_3$).

3.3.1.2. Fasanum lágfasi$_3$ er lýst á mynd A1/7 og í töflu A1/7.

3.3.1.3. Fasanum miðfasi$_{3a}$ er lýst á mynd A1/8 og í töflu A1/8.

3.3.1.4. Fasanum háfasi$_{3a}$ er lýst á mynd A1/10 og í töflu A1/10.

3.3.1.5. Fasanum hæsti fasi$_3$ er lýst á mynd A1/12 og í töflu A1/12.

3.3.2. Lota í flokki 3b

3.3.2.1. Heil lota skal samanstanda af lághraðafasa (lágfasi$_3$), miðhraðafasa (miðfasi$_{3b}$), háhraðafasa (háfasi$_{3b}$) og hæsta hraðafasa (hæsti fasi$_3$).

3.3.2.2. Fasanum lágfasi$_3$ er lýst á mynd A1/7 og í töflu A1/7.

3.3.2.3. Fasanum miðfasi$_{3b}$ er lýst á mynd A1/9 og í töflu A1/9.

3.3.2.4. Fasanum háfasi$_{3b}$ er lýst á mynd A1/11 og í töflu A1/11.

3.3.2.5. Fasanum hæsti fasi$_3$ er lýst á mynd A1/12 og í töflu A1/12.

3.4. Lengd allra fasa

3.4.1. Allir lághraðafasar skulu vara í 589 sekúndur.

3.4.2. Allir miðhraðafasar skulu vara í 433 sekúndur.

3.4.3. Allir háhraðafasar skulu vara í 455 sekúndur.

3.4.4. Allir hæstu hraðafasar skulu vara í 323 sekúndur.

3.5. WLTC-borgarlotur

Tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og hrein rafökutæki skulu prófuð með viðeigandi WLTC-lotum og WLTC-borgarlotum fyrir flokk 3a og flokk 3b (sjá 8. undirviðauka).

WLTC-borgarlota skal einungis samanstanda af lághraða- og miðhraðafösum.“

b) Í stað fyrirsagnar 4. liðar kemur eftirfarandi:

„WLTC-prófunarlota í flokki 1“.

c) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/1 kemur eftirfarandi:

„WLTC-prófunarlota í flokki 1, lágfasi$_1$“.

d) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/2 kemur eftirfarandi:

„WLTC-prófunarlota í flokki 1, miðfasi$_1$“.

e) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/1 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 1, lágfasi$_1$“.

f) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/2 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 1, miðfasi$_1$“.

g) Í stað fyrirsagnar 5. liðar kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2“.

h) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/3 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, lágfasi$_2$“.

i) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/4 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, miðfasi$_2$“.

j) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/5 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, háfasi$_2$“.

k) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/6 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, hæsti fasi$_2$“.

l) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/3 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, lágfasi$_2$“.

m) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/4 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, miðfasi$_2$“.

n) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/5 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, háfasi$_2$“.

o) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/6 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 2, hæsti fasi$_2$“.

p) Í stað fyrirsagnar 6. liðar kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3“.

q) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/7 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3, lágfasi$_3$“.

r) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/8 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3a, miðfasi$_{3a}$“.

s) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/9 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3b, miðfasi$_{3b}$“.

t) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/10 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3a, háfasi$_{3a}$“.

u) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/11 kemur eftirfarandi:
„WLTC, prófunarlota í flokki 3b, háfasi$_{3b}$“.

v) Í stað fyrirsagnar við mynd A1/12 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3, hæsti fasi$_3$“.

w) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/7 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3, lágfasi$_3$“.

x) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/8 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3a, miðfasi$_{3a}$“.

y) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/9 kemur eftirfarandi:
„WLTC-prófunarlota í flokki 3b, miðfasi$_{3b}$“.

z) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/10 kemur eftirfarandi:

„WLTC-prófunarlota í flokki 3a, háfasi$_{3a}$“.

aa) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/11 kemur eftirfarandi:

„WLTC, prófunarlota í flokki 3b, háfasi$_{3b}$“.

ab) Í stað fyrirsagnar við töflu A1/12 kemur eftirfarandi:

„WLTC-prófunarlota í flokki 3, hæsti fasi$_{3}$“.

ac) Í stað töflu A1/13 í 7. lið kemur eftirfarandi:

„*Tafla A1/13*

1 Hz prófsummur

Lota í flokki	Lotufasi	Prófsumma fyrir 1 Hz markhraða ökutækis
Flokkur 1	Lág-	11 988,4
	Mið-	17 162,8
	Lág-	11 988,4
	Samtals	41 139,6
Flokkur 2	Lág-	11 162,2
	Mið-	17 054,3
	Há-	24 450,6
	Hæsti	28 869,8
	Samtals	81 536,9
Flokkur 3a	Lág-	11 140,3
	Mið-	16 995,7
	Há-	25 646,0
	Hæsti	29 714,9
	Samtals	83 496,9
Flokkur 3b	Lág-	11 140,3
	Mið-	17 121,2
	Há-	25 782,2
	Hæsti	29 714,9
	Samtals	83 758,6“.

ad) Fyrsta málsgreinin undir fyrirsögninni í lið 8.1 fellur brott.

ae) Í stað liðar 8.2.2 kemur eftirfarandi:

„8.2.2. Niðurskölun fyrir ökutæki í flokki 2

Þar sem vandamál tengd akstursháfni varða eingöngu hæstu hraðafasana fyrir lotur í flokki 2 og flokki 3 er niðurskölun tengd þeim tímabilum í hæstu hraðafösum þar sem búist er við að vandamál tengd akstursháfni eigi sér stað (sjá myndir A1/15 og A1/16).“

af) Í stað fyrstu málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina í lið 8.2.3 kemur eftirfarandi:

„Mynd A1/16 sýnir sem dæmi hæsta hraðafasa eftir niðurskölun fyrir ökutæki í flokki 3 í WLTC-prófunarlotu.“

ag) Í lið 8.3 eftir fyrstu jöfnuna er textanum:

„f_0, f_1, f_2 eru viðeigandi ökumótstöðustuðlar, N, N/(km/klst.) og N/(km/klst.)^2 eftir því sem við á,

TM er viðeigandi prófunarmassi, kg,

v_i er hraði á tímanum i, km/klst.,

Lotutími i þar sem krafist er hámarksafls eða aflgilda sem eru nálægt hámarksafli, er: sekúnda 764 fyrir ökutæki í flokki 1, sekúnda 1574 fyrir ökutæki í flokki 2 og sekúnda 1566 fyrir ökutæki í flokki 3.“

kemur eftirfarandi:

„f_0, f_1, f_2 eru viðeigandi ökumótstöðustuðlar, N, N/(km/klst.) og N/(km/klst.)^2 eftir því sem við á,

TM er viðeigandi prófunarmassi, kg,

v_i er hraði á tímanum i, km/klst,

a_i er hröðunin á tímanum i, í km/klst^2.

Lotutími i þar sem krafist er hámarksafls eða aflgilda sem eru nálægt hámarksafli, er: sekúnda 764 fyrir lotu í flokki 1, sekúnda 1574 fyrir lotu í flokki 2 og sekúnda 1566 fyrir lotu í flokki 3.“

ah) Í stað liðar 9.1 kemur eftirfarandi:

„9.1. Almennar athugasemdir

Þessi liður gildir um ökutæki sem geta tæknilega fylgt hraðaferli viðeigandi lotu, sem tilgreind er í 1. lið þessa undirviðauka (grunnlota), á hraða sem er minni en hámarkshraði þeirra, en sem hafa hámarkshraða sem af öðrum ástæðum takmarkast við gildi sem er lægra en hámarkshraðinn í grunnlotunni. Vísa skal til þeirrar viðeigandi lotu sem „grunnlotu“ og nota hana til að ákvarða lotuna með takmarkaða hraðanum.

Í tilvikum þegar niðurskölun er beitt í samræmi við lið 8.2 skal niðurskalaða lotan notuð sem grunnlota.

Hámarkshraðinn í grunnlotunni nefnist $v_{max,cycle}$.

Hámarkshraði ökutækisins skal nefnast „takmarkaður hraði“ ökutækisins (e. *capped speed*), v_{cap}.

Ef v_{cap} er beitt í tengslum við ökutæki í flokki 3b eins og skilgreint er í lið 3.3.2 skal nota lotuna í flokki 3b sem grunnlotu. Þetta ákvæði gildir jafnvel þó að v_{cap} sé undir 120 km/klst.

Í tilvikum þegar v_{cap} er beitt skal breyta grunnlotunni eins og lýst er í lið 9.2 til að sama vegalengd náist í lotunni með takmarkaða hraðanum og í grunnlotunni.“

ai) Í stað liða 9.2.1,1 og 9.2.1,2 kemur eftirfarandi:

„9.2.1.1. Ef $v_{cap} < v_{max,medium}$ skulu vegalengdirnar fyrir miðhraðafasa grunnlotunnar $d_{base,medium}$ og millilotunnar með takmörkuðum hraða $d_{cap,medium}$ reiknaðar út með eftirfarandi jöfnu fyrir báðar lotur:

$$d_{medium} = \sum \left(\frac{(v_i + v_{i-1})}{2 \times 3,6} \times (t_i - t_{i-1}) \right), \text{ fyrir i = 591 til 1022}$$

þar sem:

$v_{max,medium}$ er hámarkshraði ökutækis fyrir miðhraðfasa, eins og talið er upp í töflu A1/2 fyrir lotu í flokki 1, í töflu A1/4 fyrir lotu í flokki 2, í töflu A1/8 fyrir lotu í flokki 3a og í töflu A1/9 fyrir lotu í flokki 3b.

9.2.1.2. Ef $v_{cap} < v_{max,high}$ skulu vegalengdirnar fyrir háhraðafasa grunnlotunnar $d_{base,high}$ og millilotunnar með takmörkuðum hraða $d_{cap,high}$ reiknaðar út með eftirfarandi jöfnu fyrir báðar lotur:

$$d_{high} = \sum \left(\frac{(v_i + v_{i-1})}{2 \times 3,6} \times (t_i - t_{i-1}) \right)$$, fyrir i = 1024 til 1477

$v_{max,high}$ er hámarkshraði ökutækis fyrir háhraðafasa eins og talið er upp í töflu A1/5 fyrir lotu í flokki 2, í töflu A1/10 fyrir lotu í flokki 3a og í töflu A1/11 fyrir lotu í flokki 3b.“

aj) Í stað annarrar málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina í lið 9.2.2 kemur eftirfarandi:

„Til að bæta upp mismun á vegalengdum milli grunnlotunnar og millilotunnar með takmörkuðum hraða skal bæta samsvarandi tímabilum með $v_i = v_{cap}$ við millilotuna með takmörkuðum hraða, eins og lýst er í liðum 9.2.2.1 til 9.2.2.3.“

ak) Í stað fyrirsagnarinnar í lið 9.2.3.1 kemur eftirfarandi:

„Lota í flokki 1“.

al) Í stað fyrirsagnarinnar í lið 9.2.3.2 kemur eftirfarandi:

„Lotur í flokki 2 og flokki 3“.

am) Jöfnunni í fyrstu línu í lið 9.2.3.2.2

„$v_{max,\ medium} \leq = v_{cap} < v_{max,\ high}$“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„$v_{max,\ medium} \leq v_{cap} < v_{max,\ high}$“.

an) Jöfnunni í fyrstu línu í lið 9.2.3.2.3

„$v_{max,\ high} < = v_{cap} < v_{max,\ exhigh}$“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„$v_{max,\ high} \leq v_{cap} < v_{max,\ exhigh}$“

ao) Eftirfarandi liðir 10 og 10.1 bætast við:

„10. Úthlutun á lotum til ökutækja

10.1. Ökutæki í tilteknum flokki skal prófað í lotunni fyrir þann sama flokk, þ.e. ökutæki í flokki 1 eru prófuð í lotu í flokki 1, ökutæki í flokki 2 eru prófuð í lotu í flokki 2, ökutæki í flokki 3a eru prófuð í lotu í flokki 3a og ökutæki í flokki 3b eru prófuð í lotu í flokki 3b. Að beiðni framleiðanda og með samþykki viðurkenningaryfirvalds má þó prófa ökutæki í lotu sem er í tölulega hærri flokki, t.d. ökutæki í flokki 2 má prófa í lotu í flokki 3. Í því tilviki skal virða muninn á milli flokka 3a og 3b og lotuna má niðurskala í samræmi við lið 8. til 8.4.“

28) Í stað 2. undirviðauka kemur eftirfarandi:

„2. undirviðauki

Val á gír og ákvörðun á gírskiptingum fyrir ökutæki með handskiptingu

1. Almenn nálgun

1.1. Reglurnar um gírskiptingu sem lýst er í þessum undirviðauka gilda um ökutæki með handskiptingu.

1.2. Þeir gírar og þær gírskiptingar sem mælt er fyrir um grundvallast á jafnvæginu milli aflsins sem þörf er á til að yfirvinna akstursmótstöðu og hröðun og aflsins frá hreyflinum í öllum mögulegum gírum í tilteknum fasa í lotu.

1.3. Útreikningur til að ákvarða gírnotkun skal byggjast á snúningshraða hreyfils og aflferli við fullt álag sem falls af snúningshraða hreyfils.

1.4. Við ákvörðun á gírnotkun ökutækja með tveggja sviða gírskiptingu (lágt og hátt), skal eingöngu taka mið af því sviði sem hannað er fyrir hefðbundinn akstur á vegum.

1.5. Forskriftum um vinnslu tengslis skal ekki beitt ef tengsli eru sjálfvirk þar sem ekki er þörf á aðkomu ökumanns til að gera þau virk eða óvirk.

1.6. Þessi undirviðauki gildir ekki um ökutæki sem eru prófuð í samræmi við 8. undirviðauka.

2. Nauðsynleg gögn og forútreikningar

Eftirfarandi gögn eru nauðsynleg og útreikningar skulu gerðir til að ákvarða hvaða gírar skuli notaðir í akstursslotu á vegkefli:

a) P_{rated}, hæsta málafl hreyfils samkvæmt yfirlýsingu framleiðanda, í kW,

b) n_{rated}, nafnsnúningshraði hreyfils sem framleiðandinn hefur lýst yfir að sé snúningshraði hreyfils þegar hreyfillinn nær hámarksafli, í $mín^{-1}$,

c) n_{idle}, lausagangshraði, í $mín^{-1}$;

mæla skal n_{idle} í minnst 1 mínútu með sýnatökutíðni sem nemur a.m.k. 1 Hz þar sem hreyfillinn gengur við heit skilyrði, í hlutlausum gír og með tengslin virk; skilyrðin að því er varðar hitastig, jaðar- og aukabúnað o.s.frv. skulu vera þau sömu og lýst er í 6. undirviðauka fyrir prófun 1;

gildið sem nota skal í þessum undirviðauka er meðalgildi mælitímabilsins, námundað eða stytt að næstu 10 $mín^{-1}$,

d) ng, er heildarfjöldi framgíra;

framgírar gírskiptingar sem eru hannaðir fyrir hefðbundinn akstur á vegum skulu númeraðir í lækkandi röð eftir hlutfallinu milli snúningshraða hreyfils í $mín^{-1}$ og hraða ökutækis í km/klst., Gír 1 er með hæsta gírhlutfallið, gír ng er gírinn með lægsta gírhlutfallið; ng ákvarðar fjölda framgíra,

e) $(n/v)_i$, hlutfall sem fæst með því að deila snúningshraða hreyfils n með hraða ökutækis v fyrir hvern gír i, frá i til ng_{max}, í $mín^{-1}$/(km/klst.); reikna skal út $(n/v)_i$ með jöfnunum í 8. lið 7. undirviðauka,

f) f_0, f_1, f_2, ökumótstöðustuðlar sem valdir eru til prófunar, N, N/(km/klst.) og N/(km/klst.)^2 eftir því sem við á,

g) n_{max}

$n_{max1} = n_{95\_high}$, hámarkssnúningshraði hreyfils þar sem 95% af nafnafli er náð, í $mín^{-1}$.

Stilla skal n_{95_high} á n_{lim} ef ekki er hægt að ákvarða n_{95_high} vegna þess að snúningshraði hreyfils er takmarkaður við lægra gildi n_{lim} fyrir alla gíra og samsvarandi afl við fullt álag er meira en 95% af nafnafli.

$n_{max2} = (n/v)(ng_{max}) \times v_{max,cycle}$

$n_{max3} = (n/v)(ng_{max}) \times v_{max,vehicle}$

þar sem:

ng_{vmax} er skilgreint eins og í i-lið 2. liðar,

$v_{max,cycle}$ er hámarkshraði hraðaferils ökutækis í samræmi við 1. undirviðauka, í km/klst.,

$v_{max,vehicle}$ er hámarkshraði ökutækis í samræmi við i-lið 2. undirviðauka, í km/klst.,

$(n/v)(ng_{vmax})$ er hlutfallið sem fæst með því að deila snúningshraða hreyfils n með hraða ökutækis v fyrir gír ng_{vmax}, í $mín^{-1}$/(km/klst.),

n_{max} er hámarksgildi n_{max1}, n_{max2} og n_{max3}, í $mín^{-1}$.

h) $P_{wot}(n)$, aflferill við fullt álag á snúningshraðasviði hreyfils

Aflferillinn skal samanstanda af nægum fjölda gagnasafna (n, P_{wot}) til þess að reikna megi út millipunkta milli samfelldra gagnasafna með línulegri brúun. Frávik í línulegri brúun frá aflferli við fullt álag í samræmi við XX. viðauka skal ekki fara yfir 2%. Fyrsta gagnasafnið skal vera við $n_{min\_drive\_set}$ (sjá k-lið 3. liðar) eða lægra. Síðasta gagnasafnið skal vera við n_{max} eða hærri snúningshraði hreyfils. Ekki er þörf á jafnri dreifingu gagnasafna en öll gagnasöfn skulu skráð.

Gagnasöfnin og gildin P_{rated} og n_{rated} skulu tekin úr aflferlinu samkvæmt yfirlýsingu framleiðanda.

Snúningshraði hreyfils við fullt álag sem ekki er tilgreindur í XX. viðauka skal ákvarðaður í samræmi við aðferðina sem lýst er í XX. viðauka,

i) Ákvörðun á ng_{vmax} og v_{max}

ng_{vmax} er gírinn sem hámarkshraði ökutækis næst í og skal ákvarðaður sem hér segir:

Ef $v_{max}(ng) \geq v_{max}(ng - 1)$ og $v_{max}(ng - 1) \geq v_{max}(ng - 2)$, þá er:

$ng_{vmax} = ng$ og $v_{max} = v_{max}(ng)$.

Ef $v_{max}(ng) < v_{max}(ng - 1)$ og $v_{max}(ng - 1) \geq v_{max}(ng - 2)$, þá er:

$ng_{vmax} = ng - 1$ og $v_{max} = v_{max}(ng - 1)$,

annars er $ng_{vmax} = ng - 2$ og $v_{max} = v_{max}(ng - 2)$

þar sem:

$v_{max}(ng)$ er hraði ökutækis þar sem nauðsynlegt ökumótstöðuafl er jafnt og tiltækt afl, P_{wot}, í gír ng (sjá mynd A2/1a).

$v_{max}(ng - 1)$ er hraði ökutækis þar sem nauðsynlegt ökumótstöðuafl er jafnt og tiltækt afl, P_{wot}, í næsta gír fyrir neðan (gír ng – 1). sjá mynd A2/1b.

$v_{max}(ng - 2)$ er hraði ökutækis þar sem nauðsynlegt ökumótstöðuafl er jafnt og tiltækt afl, P_{wot}, í gír ng – 2.

Nota skal hraðagildi ökutækis námunduð að einum aukastaf við ákvörðun á v_{max} og ng_{vmax}.

Nauðsynlegt ökumótstöðuafl, í kW, skal reikna með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{required} = \frac{f_0 \times v + f_1 \times v^2 + f_2 \times v^3}{3\,600}$$

þar sem:

v er hraði ökutækis sem tilgreindur er hér að ofan, í km/klst.

Tiltækt afl við hraða ökutækis v_{max} í gír ng, gír ng – 1 eða gír ng – 2 má ákvarða út frá aflferli við fullt álag, $P_{wot}(n)$, með eftirfarandi jöfnum:

$$n_{ng} = (n/v)_{ng} \times v_{max}(ng),$$

$$n_{ng-1} = (n/v)_{ng-1} \times v_{max}(ng - 1),$$

$$n_{ng-2} = (n/v)_{ng-2} \times v_{max}(ng - 2),$$

og með því að minnka aflgildi aflferils við fullt álag um 10%.

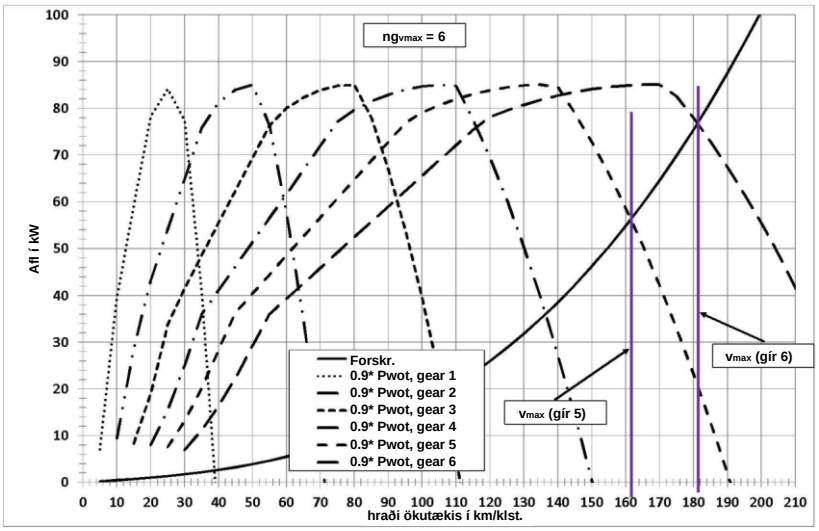
Ef nauðsyn krefur skal aðferðin hér á undan látin ná yfir jafnvel lægri gíra, þ.e. ng – 3, ng – 4, o.s.frv.

Að því er varðar takmörkun á hámarkshraða ökutækis, ef hámarkshraði ökutækis er takmarkaður við n_{lim} sem er lægra en snúningshraði hreyfils sem samsvarar skurðpunktinum á aflferli ökumótstöðunnar og tiltæka aflferilsins, þá er:

$$ng_{vmax} = ng_{max} \text{ and } v_{max} = n_{lim} / (n/v)(ng_{max}).$$

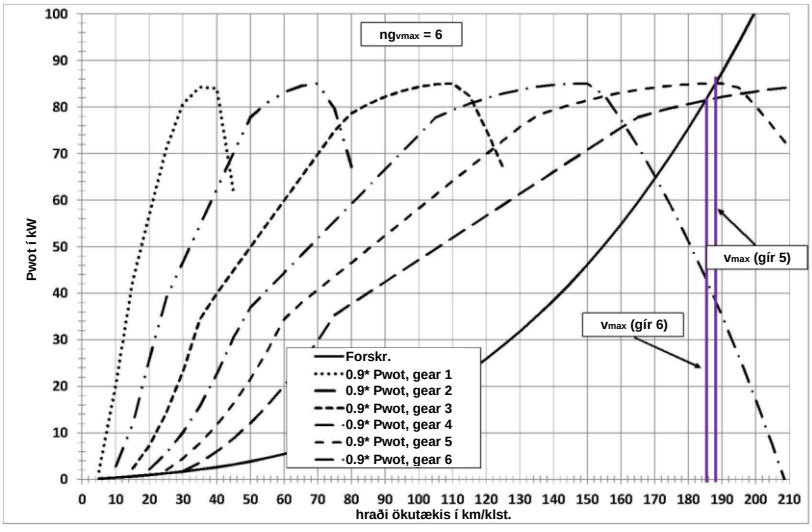
Mynd A2/1a

Dæmi þar sem ng_{max} er hæsti gírinn



Mynd A2/1b

Dæmi þar sem ng_{max} er annar hæsti gírinn



j) Útilokun klifurgírs (e. *crawler gear*)

Að beiðni framleiðanda má útiloka gír 1 ef öll eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

1) Ökutækjahópurinn er samþykktur til að draga eftirvagn,

2) $(n/v)_1 \times (v_{max} / n_{95\_high}) > 6{,}74$,

3) $(n/v)_2 \times (v_{max} / n_{95\_high}) > 3{,}85$,

4) ökutækið, sem er með massa m_t sem skilgreindur er í jöfnunni hér á eftir, getur fimm sinnum á innan við fimm mínútum tekið af stað úr kyrrstöðu á innan við fjórum sekúndum upp í móti í brekku með a.m.k. 12% halla.

$$m_t = m_{r0} + 25\ kg + (MC - m_{r0} - 25\ kg) \times 0{,}28$$

(stuðull 0,28 í jöfnunni hér að ofan skal notaður í tengslum við ökutæki í flokki N sem hafa heildarmassa ökutækis allt að 3,5 tonnum og í stað hans kemur stuðullinn 0,15 ef um er að ræða ökutæki í flokki M),

þar sem:

v_{max} er hámarkshraði ökutækis eins og tilgreint er í i. lið 2. liðar. Einungis gildið v_{max} sem er útkoma skurðpunktsins á nauðsynlegu aflferli ökumótstöðunnar og tiltæku aflferli viðeigandi gírsins skal notað í skilyrðunum í 3. og 4. lið hér að ofan. Ekki skal nota v_{max} gildi sem er útkoma takmörkunar á snúningshraða hreyfils sem kemur í veg fyrir þennan skurðpunkt á ferlum,

$(n/v)(ng_{vmax})$ er hlutfallið sem fæst með því að deila snúningshraða hreyfils n með hraða ökutækis v fyrir gír ng_{vmax}, í $mín^{-1}$/(km/klst.),

m_{r0} er massi ökutækis sem er tilbúið til aksturs, í kg,

MC er heildarmassi bílaraðar (heildarmassi ökutækis + hámarksmassi eftirvagns), í kg.

Í þessu tilviki skal gír 1 ekki notaður í akstursslotu á vegkefli og gírarnir skulu fá ný númer sem byrja á öðrum gír sem gír 1.

k) Skilgreining á n_{min_drive}

n_{min_drive} er lágmarkssnúningshraði hreyfils þegar ökutækið er á ferð, í $mín^{-1}$, eins og hér segir:

1) fyrir $n_{gear} = 1$, $n_{min\_drive} = n_{idle}$,

2) fyrir $n_{gear} = 2$,

   i. fyrir skipti úr 1. gír í 2. gír:

   $$n_{min\_drive} = 1{,}15 \times n_{idle},$$

   ii. fyrir hraðaminnkun að kyrrstöðu:

   $$n_{min\_drive} = n_{idle}.$$

   iii. fyrir öll önnur akstursskilyrði:

   $$n_{min\_drive} = 0{,}9 \times n_{idle}.$$

3) fyrir $n_{gear} > 2$, skal n_{min_drive} ákvarðað með:

$$n_{min\_drive} = n_{idle} + 0{,}125 \times (n_{rated} - n_{idle}).$$

Vísa skal til þessa gildis sem $n_{min\_drive\_set}$.

Endanlegar niðurstöður fyrir n_{min_drive} skulu námundaðar að næstu heilu tölu. *Dæmi:* 1199,5 verður 1200, 1199,4 verður 1199.

Gildi sem eru hærri en $n_{min\_drive\_set}$ má nota í tengslum við $n_{gear} > 2$ ef framleiðandi óskar eftir því. Í því tilviki getur framleiðandinn tilgreint eitt gildi fyrir hröðunarfasa/fasa með stöðugum hraða ($n_{min\_drive\_up}$) og annað gildi fyrir hraðaminnkunarfasa ($n_{min\_drive\_down}$).

Sýni sem hafa hröðunargildi $\geq -0{,}1389\ m/s^2$ skulu tilheyra hröðunarfasanum/fasa með stöðugum hraða.

Á upphafstímabili (t_{start_phase}) getur framleiðandinn einnig tilgreint hærri gildi ($n_{min\_drive\_start}$ og/eða $n_{min\_drive\_up\_start}$) fyrir gildin n_{min_drive} og/eða $n_{min\_drive\_up}$ fyrir $n_{gear} > 2$ en sem þau sem tilgreind eru hér að ofan.

Framleiðandinn skal tilgreina upphafstímabilið en það skal ekki vara lengur en lághraðafasi lotunnar og skal ljúka í stöðvunarfasa svo að engin breyting verði á n_{min_drive} á stuttum spöl.

Öll sérstaklega valin n_{min_drive} gildi skulu vera jöfn eða hærri en $n_{min\_drive\_set}$ en skulu ekki fara yfir $(2 \times n_{min\_drive\_set})$.

Öll sérstaklega valin n_{min_drive} gildi og t_{start_phase} skulu koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

Einungis $n_{min\_drive\_set}$ skal notað sem neðri mörk fyrir aflferilinn við fullt álag í samræmi við h-lið 2. liðar.

l) Prófunarmassi ökutækis, kg

3. Útreikningar á nauðsynlegu afli, snúningshraða hreyfils, tiltæku afli og hvaða gíra er mögulegt að nota

3.1. Útreikningur á nauðsynlegu afli

Fyrir hverja sekúndu j í ferli akturslotu, skal nota eftirfarandi jöfnu til að reikna út aflið sem þörf er á til að yfirvinna akstursmótstöðu og ná hröðun:

$$P_{required,j} = \left(\frac{f_0 \times v_j + f_1 \times v_j^2 + f_2 \times v_j^3}{3\,600}\right) + \frac{kr \times a_j \times v_j \times TM}{3\,600}$$

þar sem:

$P_{required,j}$ er nauðsynlegt afl á sekúndu j, í kW,

a_j er hröðun ökutækisins á sekúndu j, m/s^2, og er reiknuð út á eftirfarandi hátt:

$$a_j = \frac{(v_{j+1} - v_j)}{3{,}6 \times (t_{j+1} - t_j)},$$

kr er stuðull sem tekur mið af tregðumótstöðu drifrásar meðan á hröðun stendur og er stilltur á 1,03.

3.2. Ákvörðun á snúningshraða hreyfils

Fyrir hverja v_j < 1 km/klst. skal gera ráð fyrir að ökutækið sé kyrrstætt og snúningshraði hreyfils stilltur á n_{idle}. Gírstöng skal sett í hlutlausan gír með tengsli virk nema 1 sekúndu fyrir upphaf hröðunar úr kyrrstöðu þar sem fyrsti gír skal valinn með tengsli óvirk.

Fyrir hvern $v_j \geq 1$ km/klst. í ferli akturslotu og hvern gír i, i = 1 að ng_{max}, skal reikna út snúningshraða hreyfils, $n_{i,j}$, með eftirfarandi jöfnu:

$$n_{i,j} = (n/v)_i \times v_j$$

Framkvæma skal útreikninginn með hlaupakommutölum og útkomurnar skulu ekki námundaðar.

3.3. Val á mögulegum gírum með tilliti til snúningshraða hreyfils

Mögulegt er að velja eftirfarandi gíra fyrir akstur hraðaferilsins við v_j:

a) allir gírar i < ng_{vmax} þar sem $n_{min\_drive} \leq n_{i,j} \leq n_{max1}$,

b) allir gírar i < ng_{vmax} þar sem $n_{min\_drive} \leq n_{i,j} \leq n_{max2}$,

c) Gír 1 ef $n_{1,j} < n_{min\_drive}$.

Ef $a_j \leq 0$ og $n_{i,j} \leq n_{idle}$, skal stilla $n_{i,j}$ á n_{idle} og tengsli gerð óvirk.

Ef $a_j \geq 0$ og $n_{i,j} < \max(1{,}15 \times n_{idle}$; lágmarkssnúningshraði hreyfils í $P_{wot}(n)$ ferli) skal $n_{i,j}$ stillt að hámarki $1{,}15 \times n_{idle}$ eða $(n/v)_i \times v_j$ og tengsli stillt á „óskilgreint“.

„Óskilgreint“ nær yfir alla þá stöðu sem tengsli getur verið í á milli óvirkrar stöðu og virkrar stöðu, með hliðsjón af einstakri hönnun hreyfils og gírskiptingar. Í þessu tilviki má raunverulegur snúningshraði hreyfils víkja frá útreiknuðum snúningshraða hreyfilsins.

3.4. Útreikningur á tiltæku afli

Tiltækt afl fyrir hvern mögulegan gír i og hvert hraðagildi ökutækis í ferli aksturlotunnar v_i skal reiknað út með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{available\_i,j} = P_{wot}\ (n_{i,j}) \times (1 - (SM + ASM))$$

þar sem:

P_{rated} er nafnafl, í kW,

P_{wot} er tiltækt afl við $n_{i,j}$ við mestu álagsskilyrði í aflferli við fullt álag,

SM eru öryggismörk þar sem tekið er tillit til mismunar á aflferli við fullt álag í kyrrstöðu og tiltæku afli við skiptingu. SM er fastsett við 10%,

ASM eru viðbótaraflöryggismörk, sem beita má að ósk framleiðanda.

Sé þess óskað skal framleiðandinn leggja fram ASM-gildin (með lækkun wot-aflsins í prósentum) ásamt gagnamengjum fyrir $P_{wot}(n)$ eins og sýnt er í dæminu í töflu A2/1. Nota skal línulega brúun á milli samfelldra gagnapunkta. ASM er takmarkað við 50%.

Beiting ASM þarfnast samþykkis viðurkenningaryfirvaldsins.

Tafla A2/1

n	Pwot	SM-prósenta	ASM-prósenta	$P_{available}$
mín^{-1}	kW			kW
700	6,3	10,0	20,0	4,4
1 000	15,7	10,0	20,0	11,0
1 500	32,3	10,0	15,0	24,2
1 800	56,6	10,0	10,0	45,3
1 900	59,7	10,0	5,0	50,8
2 000	62,9	10,0	0,0	56,6
3 000	94,3	10,0	0,0	84,9
4 000	125,7	10,0	0,0	113,2
5 000	157,2	10,0	0,0	141,5
5 700	179,2	10,0	0,0	161,3
5 800	180,1	10,0	0,0	162,1
6 000	174,7	10,0	0,0	157,3
6 200	169,0	10,0	0,0	152,1
6 400	164,3	10,0	0,0	147,8
6 600	156,4	10,0	0,0	140,8

3.5. Ákvörðun mögulegra gíra til að nota

Ákvarða skal hvaða gíra er mögulegt að nota með eftirfarandi skilyrðum:

a) skilyrði liðar 3.3 hafa verið uppfyllt og

b) fyrir $n_{gear} > 2$, ef $P_{available\_i,j} \geq P_{required,j}$.

Upphaflegi gírinn sem nota skal hverja sekúndu j í ferli akstursslotunnar er hæsti endanlegi, mögulegi gír, i_{max}; þegar tekið er af stað úr kyrrstöðu skal eingöngu nota fyrsta gír.

Lægsti endanlegi, mögulegi gír er i_{min}.

4. Frekari kröfur í tengslum við leiðréttingar og/eða breytingar á notkun gíra

Upphaflegt val á gír skal athugað og það lagfært til að koma í veg fyrir of tíðar gírskiptingar og til að tryggja akstureshæfni og hagkvæmni.

Hröðunarfasi er tímabil sem varir lengur en 2 sekúndur með hraða ökutækis sem nemur ≥ 1 km/klst. og einhalla aukningu á hraða ökutækis. Hraðaminnkunararfasi er tímabil sem varir lengur en 2 sekúndur með hraða ökutækis sem nemur ≥ 1 km/klst. og einhalla minnkun á hraða ökutækis.

Leiðréttingar og/eða breytingar skulu gerðar í samræmi við eftirfarandi kröfur:

a) Ef þörf er á gír sem er einu þrepi ofar (n +1) í einungis eina sekúndu og gírarnir á undan og eftir eru sami gírinn (n) eða einn þeirra er einu þrepi neðar (n – 1) skal leiðrétta gírinn (n + 1) yfir í gír n.

Dæmi:

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1,

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1.

Gíranotkun í hröðunarfasa þegar hraði ökutækis er ≥ 1 km/klst. skal beitt í a.m.k. 2 sekúndur (t.d. í stað gírraðarinnar 1, 2, 3, 3, 3, 3, 3 kemur röðin 1, 1, 2, 2, 3, 3, 3). Þessi krafa gildir ekki um niðurskiptingar meðan á hröðunarfasa stendur. Leiðrétta skal slíkar niðurskiptingar í samræmi við b-lið 4. liðar. Ekki skal sleppa úr gírum í hröðunarfasa.

Skipting upp um tvo gíra er þó heimil við umbreytinguna frá hröðunarfasa yfir í fasa með stöðugum hraða ef tímalengd fasa með stöðugum hraða er lengri en fimm sekúndur.

b) Ef krafist er niðurskiptingar meðan á hröðunarfasanum stendur er merkt við þann gír sem krafist er við þessa niðurskiptingu (i_{DS}). Upphaf leiðréttingarferlisins er ákvarðað annað hvort á síðustu sekúndunni áður en i_{DS} greindist eða á upphafspunkti hröðunarfasans ef öll tímagildi á undan hafa gíra > i_{DS}. Síðan skal gera eftirfarandi athugun:

Vinna skal aftur á bak frá lokum hröðunarfasans til að greina nýjasta tíu sekúndna gluggann sem inniheldur i_{DS} í annað hvort tvær eða fleiri samfelldar sekúndur eða tvær eða fleiri stakar sekúndur. Síðasta notkunin á i_{DS} í þessum glugga skilgreinir endapunkt leiðréttingarferlisins. Á milli upphafs og loka leiðréttingartímabilsins skulu allar kröfur um gíra hærri en i_{DS} leiðréttar að kröfu um i_{DS}.

Frá lokum leiðréttingartímabilsins til loka hröðunarfasans skal fjarlægja allar niðurskiptingar sem einungis vöruðu í eina sekúndu ef niðurskiptingin innihélt eitt þrep. Ef niðurskiptingin innihélt tvö þrep skulu allar kröfur um gíra sem eru hærri eða jafnir i_{DS} allt að nýjasta tilviki af i_{DS} leiðréttar að (i_{DS} + 1).

Þessi síðasta leiðrétting gildir einnig frá upphafi til loka hröðunarfasans ef ekki greinist neinn tíu sekúndna gluggi sem inniheldur i_{DS} í annað hvort tvær eða fleiri samfelldar sekúndur eða tvær eða fleiri stakar sekúndur.

Dæmi:

i. Ef gírnotkun sem er fyrst reiknuð út er:

2, 2, 3, [3, 4, 4, 4, 4, 3, 4, 4, 4, 4], 4, 4, 3, 4, 4, 4,

skal gírnotkunin leiðrétt að:

2, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4.

ii. Ef gírnotkun sem er fyrst reiknuð út er:

2, 2, 3, [3, 4, 4, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 4], 4, 4, 4, 4, 3, 4,

skal gírnotkunin leiðrétt að:

2, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4.

iii. Ef gírnotkun sem er fyrst reiknuð út er:

2, 2, 3, [3, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4], 4, 4, 4, 3, 3, 4,

skal gírnotkunin leiðrétt að:

2, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 4.

Fyrstu tíu sekúndna gluggarnir eru tilgreindir með hornklofum í dæmunum hér að ofan.

Þeir gírar sem eru undirstrikaðir (t.d. 3. gír) eru þau tilvik sem gætu leitt til leiðréttingar á gírnum á undan.

Ekki skal gera þessa leiðréttingu fyrir gír 1.

c) Ef gír i er notaður í tímaröð á milli 1 til 5 sekúndna og gírinn á undan þessari röð er einu þrepi neðar og gírinn á eftir þessari röðun er einu eða tveimur þrepum neðar en innan þessarar raðar eða gírinn á undan þessari röð er tveimur þrepum neðar og gírinn á eftir þessari röð er einu þrepi neðar en innan raðarinnar skal gírinn fyrir röðina leiðréttur að hámarki þeirra gíra sem eru á undan og eftir röðinni.

Dæmi:

i. í stað gírraðarinnar i – 1, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1,

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1.

ii. í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1,

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1, i – 1.

iii. í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1,

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1.

iv. í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1,

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1.

v. í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1.

í stað gírraðarinnar i – 1, i, i, i, i, i, i – 2 kemur:

i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 2,

í stað gírraðarinnar i – 2, i, i, i, i, i, i – 1 kemur:

i – 2, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1, i – 1.

Í i. til v. lið skal í öllum tilvikum uppfylla $i - 1 \geq i_{min}$.

d) Ekki skal skipta upp í hærri gír við umbreytinguna frá hröðunarfasa eða fasa með stöðugum hraða yfir í hraðaminnkunarfasa ef gírinn í fasanum sem fylgir hraðaminnkunarfasanum er lægri en sá gír sem skipta á upp í.

Dæmi:

Ef $v_i \leq v_{i+1}$ og $v_{i+2} < v_{i+1}$ og gír i = 4 og gír (i + 1 = 5) og gír (i + 2 = 5) skal stilla gír (i + 1) og gír (i + 2) yfir í 4 ef gírinn í fasanum sem fylgir hraðaminnkunarfasanum er gír 4 eða lægri. Í öllum eftirfarandi lotuferlispunktum með gír 5 í hraðaminnkunarfasanum skal gírinn einnig vera stilltur yfir í 4. Skipta skal upp um gír ef gírinn sem fylgir hraðaminnkunarfasanum er gír 5.

Skipta skal upp um einn gír ef skipt er upp um tvo gíra við umbreytinguna og í fyrsta hraðaminnkunarfasanum.

Ekki skal skipta upp í hærri gír meðan á hraðaminnkunarfasanum stendur.

e) Meðan á hraðaminnkunararfasa stendur skal nota gíra með $n_{gear} > 2$ á meðan snúningshraði hreyfils fer ekki niður fyrir n_{min_drive}.

Nota skal gír 2 í hraðaminnkunarfasa í stuttum spöl lotunnar (ekki við lokin á stuttum spöl) á meðan snúningshraði hreyfils fer ekki niður fyrir ($0{,}9 \times n_{idle}$).

Ef snúningshraði hreyfils fellur niður fyrir n_{idle}, skulu tengsli gerð óvirk.

Ef hraðaminnkunarfasinn er síðasti hlutinn af stuttum spöl sem farinn er rétt á undan stöðvunarfasa skal nota 2. gír á meðan snúningshraði hreyfils fer ekki niður fyrir n_{idle}.

f) Ef tímalengd gírraðar sem er á milli tveggja gírraða sem vara í þrjár sekúndur eða lengur er einungis 1 sekúnda í hraðaminnkunarfasa skal gír 0 koma í stað hennar og tengsli gerð óvirk.

Ef tímalengd gírraðar sem er á milli tveggja gírraða sem vara í þrjár sekúndur eða lengur eru 2 sekúndur í hraðaminnkunarfasa skal gír 0 koma í stað hennar á fyrstu sekúndunni og á annarri sekúndunni skal koma sá gír sem kemur að loknu tveggja sekúndna tímabilinu. Tengsli skulu gerð óvirk fyrstu sekúnduna.

Dæmi: Í stað gírraðarinnar 5, 4, 4, 2 kemur 5, 0, 2, 2.

Þessi krafa gildir einungis ef gírinn sem fylgir tveggja sekúndna tímabilinu er > 0.

Ef margar gírraðir sem vara í eina eða tvær sekúndur koma í röð skal framkvæma leiðréttingar með eftirfarandi hætti:

Gírröð i, i, i, i – 1, i – 1, i – 2 eða i, i, i, i – 1, i – 2, i – 2 skal breytt í i, i, i, 0, i – 2, i – 2.

Gírröð á borð við i, i, i, i – 1, i – 2, i – 3 eða i, i, i, i – 2, i – 2, i – 3 eða aðrar mögulegar samsetningar skal breytt í i, i, i, 0, i – 3, i – 3.

Einnig skal gera þessa breytingu á gírröðum ef hröðunin er ≥ 0 fyrstu tvær sekúndurnar og < 0 þriðju sekúnduna eða ef hröðunin er ≥ 0 síðustu tvær sekúndurnar.

Mögulegt er að gírraðir sem vara í eina eða tvær sekúndur í röð geti varað í allt að sjö sekúndur þegar um er að ræða óvenjulegar gerðir af gírskiptingum. Í slíkum tilvikum skulu eftirfarandi kröfur varðandi leiðréttingar fylgja til viðbótar við leiðréttinguna hér á undan, í öðru þrepi:

Gírröð j, 0, i, i, i – 1, k með j > (i + 1) og k ≤ (i – 1) skal breytt í j, 0, i – 1, i – 1, i – 1, k ef gír (i – 1) er einu eða tveimur þrepum undir i_{max} í þriðju sekúndu þessarar raðar (eitt þrep eftir gír 0).

Gírröð j, 0, i, i, i – 1, k með j > (i + 1) og k ≤ (i – 1) skal breytt í j, 0, 0, k, k, k ef gír (i – 1) er fleiri en tveimur þrepum undir i_{max} í þriðju sekúndu þessarar raðar.

Gírröð j, 0, i, i, i – 2, k með j > (i + 1) og k ≤ (i – 2) skal breytt í j, 0, i – 2, i – 2, i – 2, k, ef gír (i – 2) er einu eða tveimur þrepum undir i_{max} í þriðju sekúndu þessarar raðar (eitt þrep eftir gír 0).

Gírröð j, 0, i, i, i – 2, k með j > (i + 1) og k ≤ (i – 2) skal breytt í j, 0, 0, k, k, k ef gír (i – 1) er fleiri en tveimur þrepum undir i_{max} í þriðju sekúndu þessarar raðar.

Í öllum tilvikum sem tilgreind eru hér á undan í þessum undirlið eru tengslin gerð óvirk (gír 0) í eina sekúndu til að forðast of mikinn snúningshraða hreyfils fyrir þá sekúndu. Ef þetta er ekki vandamál og óski framleiðandinn þess er heimilt er að nota lægri gírinn í sekúndunni sem fylgir beint á eftir í stað fyrir gír 0 við niðurskiptingar um allt að þrjú þrep. Skrásetja skal notkunina á þessum valkosti.

Ef hraðaminnkunarfasinn er lokahluti af stuttum spöl skömmu fyrir stöðvunarfasa og síðasti gírinn > 0 á undan stöðvunarfasanum er notaður einungis að sem nemur tveimur sekúndum, skal í staðinn nota gír 0 og gírstöng stillt í hlutlausan gír og tengslin höfð virk.

Dæmi: Í stað gírraðar 4, 0, 2, 2, 0 í síðustu fimm sekúndurnar á undan stöðvunarfasa kemur 4, 0, 0, 0, 0. Í stað gírraðar 4, 3, 3, 0 í síðustu fjórar sekúndurnar á undan stöðvunarfasa kemur 4, 0, 0, 0.

Í þessum hraðaminnkunarfösum er ekki leyfilegt að skipta niður í fyrsta gír.

5. Beita skal ákvæðum a- til f-liðar í 4. lið hverjum á eftir öðrum og skima allan feril aksturslotunnar í hverju tilviki fyrir sig. Þar sem breytingar á a- til f-lið 4. liðar búa til mögulegar nýjar gírraðir skulu þær skoðaðar þrisvar sinnum og þeim breytt ef nauðsyn krefur.

Í því skyni að unnt sé að leggja mat á réttan útreikning, skal reikna út meðalgír fyrir v ≥ 1 km/klst., námunda að fjórum aukastöfum, og tilgreina í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.“

29) Ákvæðum 4. undirviðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað liðar 2.4 kemur eftirfarandi:

„2.4. f_0, f_1, f_2 eru ökumótstöðustuðlar ökumótstöðujöfnunnar $F = f_0 + f_1 \times v + f_2 \times v^2$, ákvarðaðir í samræmi við þennan undirviðauka.

f_0 er fastur ökumótstöðustuðull og skal námundaður að einum aukastaf, í N,

f_1 er fyrsta stigs ökumótstöðustuðull og skal námundaður að þremur aukastöfum, í N/(km/klst.),

f_2 er annars stigs ökumótstöðustuðull og skal námundaður að fimm aukastöfum, í $N(km/klst.)^2$.

Ökumótstöðustuðlarnir skulu reiknaðir út með aðhvarfsgreiningu minnstu fervika yfir allt gildisvið viðmiðunarhraðapunktanna, nema annað sé tekið fram.“

b) Í stað fyrstu málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina í lið 2.5.3 kemur eftirfarandi:

„Ef ökutækið er prófað í fjórhjóladrifi á vegkefli skal jafngildi tregðumassa vegkeflisins stillt á viðeigandi prófunarmassa.“

c) Eftirfarandi liður 2.6 bætist við:

„2.6. Nota skal viðbótarlóð til að stilla prófunarmassann þannig að þyngdardreifing þess ökutækis sé nokkurn veginn sú sama og massi ökutækisins þegar það er tilbúið til aksturs. Ef um er að ræða ökutæki í flokki N eða farþegabifreiðar sem eru byggðar á ökutækjum í flokki N skal staðsetning viðbótarlóðanna vera dæmigerð og rökstyðja skal þetta fyrir viðurkenningaryfirvaldinu, óski það þess. Þyngdardreifing ökutækisins skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum og skal hún notuð í öllum síðari prófunum til að ákvarða ökumótstöðu.“

d) Í stað 3. liðar og liðar 3.1 kemur eftirfarandi:

„3. Almennar kröfur

Framleiðandinn ber ábyrgð á nákvæmni ökumótstöðustuðlanna og skal tryggja hana fyrir hvert raðsmíðað ökutæki innan ökumótstöðuhópsins. Vikmörk í ákvörðun ökumótstöðu, hermun og útreikningi skulu ekki notuð til að vanmeta ökumótstöðu raðsmíðaðra ökutækja. Að beiðni viðurkenningaryfirvalds skal sýna fram á nákvæmni ökumótstöðustuðla fyrir einstakt ökutæki.

3.1. Heildarmælinákvæmni, samkvæmni, upplausn og tíðni

Heildarmælinákvæmni sem krafist er skal vera eftirfarandi:

a) Nákvæmni á hraða ökutækis: ±0,2 km/klst. með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 10 Hz,

b) Tími: lágmarksnákvæmni: ±10 ms; lágmarksnákvæmni og tíðni: 10 ms,

c) Nákvæmni snúningsvægis hjóla: ±6 Nm eða ±0,5% af mældu hámarksheildarsnúningsvægi fyrir allt ökutækið, hvor talan sem er hærri, með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 10 Hz,

d) Nákvæmni vindhraða: ±0,3 m/s með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 1 Hz,

e) Nákvæmni vindáttar: ±3°, með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 1 Hz,

f) Nákvæmni lofthita: ±1 °C, með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 0,1 Hz,

g) Nákvæmni loftþrýstings: ±0,3 kPa, með tíðni mælinga sem nemur a.m.k. 0,1 Hz,

h) Massi ökutækis mældur á sömu vigt fyrir og eftir prófunina: ±10 kg (±20 kg fyrir ökutæki > 4000 kg),

i) Nákvæmni þrýstings í hjólbörðum: ±5 kPa,

j) Nákvæmni snúningshraða hjóla: ±0,05 s^{-1} eða 1%, hvor talan sem er hærri.“

e) Í stað liða 3.2.5., 3.2.6. og 3.2.7. kemur eftirfarandi:

„3.2.5. Hjól sem snúast

Til að ákvarða loftaflfræðileg áhrif hjóla á tilhlýðilegan hátt skulu hjól prófunarökutækis snúast á þannig hraða að hraði ökutækisins sem fæst er innan við ±3 km/klst. af vindhraðanum.

3.2.6. Hreyfanlegt belti

Til að líkja eftir streymi í straumefni við undirvagn prófunarökutækis skulu vindgöng útbúin með hreyfanlegu belti sem nær frá framenda til afturenda ökutækisins. Snúningshraði beltisins skal vera innan við ±3 km/klst. af vindhraða.

3.2.7. Straumhorn straumefnis

Á níu mismunandi stöðum sem dreifast jafnt á svæði stútsins skulu frávik kvaðratmeðaltalsrótar af bæði skurðarhorni α og geighorni β (Y-, Z-plan) við úttak stútsins ekki vera yfir 1°.“

f) Í stað liðar 3.2.12 kemur eftirfarandi:

„3.2.12. Mælinákvæmni

Nákvæmni mælds krafts skal vera innan við ±3 N.“

g) Í stað liða 4.1.1.1, 4.1.1.1.1 og 4.1.1.1.2 kemur eftirfarandi:

„4.1.1.1. Leyfileg vindskilyrði

Leyfilegum hámarksvindskilyrðum við ákvörðun á ökumótstöðu er lýst í liðum 4.1.1.1.1 og 4.1.1.1.2.

Í því skyni að ákvarða nýtileika þeirrar gerðar vindmælingar sem á að nota, skal ákvarða meðalgildi vindhraða með samfelldri mælingu á vindhraða með viðurkenndu tæki til veðurfræðirannsókna, á stað og í hæð yfir yfirborði vegar meðfram prófunarakbrautinni þar sem dæmigerðustu vindskilyrðin er að finna.

Ef ekki er mögulegt að gera prófanir í gagnstæðar áttir á sama hluta prófunarbrautar (t.d. á sporöskjulaga prófunarbraut með skyldubundinni aksturstefnu), skulu vindhraði og vindátt mæld á hverjum hluta prófunarbrautarinnar. Í slíku tilviki ákvarðar hærri mældur meðalvindhraði hvaða gerð vindmælingar skuli notuð og lægri mældur meðalvindhraði ákvarðar viðmiðunina um heimild til sleppa vindleiðréttingu.

4.1.1.1.1. Leyfileg vindskilyrði þegar staðbundin vindmæling er notuð

Staðbundin vindmæling skal aðeins notuð þegar vindhraði á 5 sekúndna tímabili er innan við 5 m/s að meðaltali og vindhviður eru ekki meiri en 8 m/s og vara innan við 2 sekúndur. Að auki skal meðaltal vigurþáttar (e. *vector componen*t) vindhraða þvert á prófunarakbraut vera innan við 2 m/s við hverja gilda umferð prófunarkeyrslu. Umferðir prófunarkeyrslna sem uppfylla ekki ofangreindar viðmiðanir skulu útilokaðar frá greiningunni. Allar vindleiðréttingar skulu reiknaðar út eins og tilgreint er í lið 4.5.3. Sleppa má vindleiðréttingu þegar lægsti mældi meðalvindhraði nemur 2 m/s eða minna.

4.1.1.1.2. Leyfileg vindskilyrði þegar innbyggð vindmæling er notuð

Við prófanir með innbyggðum vindmæli skal nota búnað eins og lýst er í lið 4.3.2. Meðalgildi vindhraða á prófunarakbraut við hverja gilda prófunarkeyrslu skal vera undir 7 m/s með vindhviðum innan við 10 m/s í meira en tvær sekúndur. Að auki skal meðaltal vigurþáttar vindhraða þvert á veg vera innan við 4 m/s við hverja gilda umferð prófunarkeyrslu. Umferðir prófunarkeyrslna sem uppfylla ekki ofangreindar viðmiðanir skulu útilokaðar frá greiningunni.“

h) Í stað liðar 4.2.1.1 kemur eftirfarandi:

„4.2.1.1. Kröfur varðandi val á prófunarökutækjum“

i) Eftirfarandi liðir 4.2.1.1.1 og 4.2.1.1.2 bætast við:

„4.2.1.1.1. Án þess að nota brúunaraðferðina

Úr hópnum skal velja prófunarökutæki (ökutæki H) sem býr yfir samsetningu eiginleika sem tengjast ökumótstöðu (þ.e. massa, loftnúningsviðnámi og snúningsmótstöðu hjólbarða) sem hafa mesta orkuþörf í lotu (sjá liði 5.6 og 5.7 í þessum viðauka).

Ef loftaflfræðileg áhrif mismunandi hjóla innan eins brúunarhóps eru ekki þekkt skal valið byggjast á hæsta loftnúningsviðnámi sem búast má við. Til viðmiðunar má búast við að hæsta loftnúningsviðnám sé með hjólum sem eru með a) mestu breiddina, b) stærsta þvermálið og c) opnustu uppbygginguna (í þessari röð eftir mikilvægi).

Val á hjólum skal fara fram til viðbótar við kröfur í tengslum við mestu orkuþörf lotu.

4.2.1.1.2. Notkun brúunaraðferðar

Að ósk framleiðanda er heimilt að beita brúunaraðferð.

Í þessu tilviki skal velja tvö prófunarökutæki úr hópnum sem uppfylla kröfuna fyrir viðkomandi hóp.

Prófunarökutæki H er það ökutæki sem hefur hærri, og þá helst hæstu, orkuþörf lotu í því vali, prófunarökutæki L það sem hefur lægri, og þá helst lægstu, orkuþörf lotu í því vali.

Allur valfrjáls búnaður og/eða öll lögun yfirbyggingar sem kosið er að brúunaraðferðin taki ekki tillit til þegar henni er beitt skal vera eins í bæði prófunarökutækjum H og L á þann hátt að þessar gerðir af valfrjálsum búnaði hafi hæstu samsetningu orkuþarfar lotu þegar kemur að þeim eiginleikum sem hafa með ökumótstöðu að gera (þ.e. massa, loftnúningsviðnám og snúningsmótstöðu hjólbarða).

Í tilvikum þar sem hægt er að afhenda einstök ökutæki með heilu setti af venjulegum hjólum og hjólbörðum ásamt heilu setti af snjóhjólbörðum (með 3PMS-merkingu – fjall með þremur toppum og snjókorni (e. *3 Peaked Mountain and Snowflake*)) með eða án hjóla skulu viðbótarhjólin/-hjólbarðarnir ekki teljast vera valfrjáls búnaður.

Til viðmiðunar ætti að uppfylla eftirfarandi lágmarks Delta milli ökutækja H og L fyrir þann eiginleika sem varðar ökumótstöðu:

i. Massi að lágmarki 30 kg,

ii. snúningsmótstaða að lágmarki 1,0 kg/t,

iii. loftnúningsviðnám $C_D \times A$ að lágmarki 0,05 m^2.

Til að ná fram hæfilegu Delta á milli ökutækja H og L í tengslum við tiltekinn eiginleika sem varðar ökumótstöðu getur framleiðandinn gert ökutæki H verra með tilbúnum hætti, t.d. með því að nota meiri prófunarmassa.“

j) Í stað liðar 4.2.1.2 kemur eftirfarandi:

„4.2.1.2. Kröfur varðandi hópa“.

k) Eftirfarandi liðir 4.2.1.2.1 til 4.2.1.2.3.4 bætast við:

„4.2.1.2.1. Kröfur varðandi notkun brúunarhóps án þess að nota brúunaraðferðina

Varðandi viðmiðanirnar sem skilgreina brúunarhóp, sjá lið 5.6 í þessum viðauka.

4.2.1.2.2. Kröfur varðandi notkun brúunarhóps með brúunaraðferðinni eru:

a) Uppfylling viðmiðananna um brúunarhópa í lið 5.6 í þessum viðauka,

b) uppfylling krafnanna í liðum 2.3.1 og 2.3.2 í 6. undirviðauka,

c) framkvæmd útreikninganna í lið 3.2.3.2 í 7. undirviðauka.

4.2.1.2.3. Kröfur varðandi notkun á ökumótstöðuhópnum

4.2.1.2.3.1. Að beiðni framleiðandans og að uppfylltri viðmiðun liðar 5.7 í þessum viðauka skal reikna út gildin fyrir ökumótstöðu ökutækja H og L í brúunarhóp.

4.2.1.2.3.2. Vísa skal til prófunarökutækja H og L eins og þau eru skilgreind í lið 4.2.1.1.2 sem H_R og L_R að því er varðar ökumótstöðuhópinn.

4.2.1.2.3.3. Til viðbótar við kröfurnar sem varða brúunarhópa í lið 2.3.1 og 2.3.2 í 6. undirviðauka, skal mismunur á orkuþörf H_R og L_R í ökumótstöðuhópi vera a.m.k. 4% og ekki yfir 35% á grundvelli H_R fyrir heila WLTC-prófunarlotu í flokki 3.

Ef fleiri en ein gerð gírskiptingar tilheyrir ökumótstöðuhópnum skal nota gírskiptingu með mesta afltapinu til að ákvarða ökumótstöðu.

4.2.1.2.3.4. Ef það sem veldur núningsmuninum er Delta fyrir ökumótstöðu vegna valfrjáls búnaðar ökutækisins er ákvarðað í samræmi við lið 6.8 skal nýr ökumótstöðuhópur reiknaður út og í þeim útreikningi skal vera innifalið Delta fyrir ökumótstöðu bæði ökutækis L og ökutækis H í þeim nýja ökumótstöðuhópi.

$$f_{0,N} = f_{0,R} + f_{0,Delta}$$

$$f_{1,N} = f_{1,R} + f_{1,Delta}$$

$$f_{2,N} = f_{2,R} + f_{2,Delta}$$

þar sem:

N vísar til ökumótstöðustuðla nýja ökumótstöðuhópsins,

R vísar til ökumótstöðustuðla ökumótstöðuhópsins sem notaður er til viðmiðunar,

Delta vísar til Deltastuðla ökumótstöðu sem eru ákvarðaðir í lið 6.8.1.“

l) Í stað liða 4.2.1.3 og 4.2.1.3.1 kemur eftirfarandi:

„4.2.1.3. Leyfilegar samsetningar við val á prófunarökutækjum og kröfum varðandi hópa

Tafla A4/1 sýnir leyfilegar samsetningar við val á prófunarökutækjum og kröfum varðandi hópa eins og lýst er í liðum 4.2.1.1 og 4.2.1.2.

Tafla A4/1

Leyfilegar samsetningar við val á prófunarökutækjum og kröfum varðandi hópa

Kröfur sem ber að uppfylla:	1) Án brúunaraðferðar	2) Brúunaraðferð án ökumótstöðuhóps	3) Notkun ökumót-stöðuhópsins	4) Brúunaraðferð með einum eða fleiri ökumót-stöðuhópum
Prófunarökutæki fyrir ökumótstöðu	Liður 4.2.1.1.1.	Liður 4.2.1.1.2.	Liður 4.2.1.1.2.	á.e.v.
Hópur	Liður 4.2.1.2.1.	Liður 4.2.1.2.2.	Liður 4.2.1.2.3.	Liður 4.2.1.2.2.
Viðbótarkröfur	engar	engar	engar	Notkun 3. dálks „Notkun ökumót-stöðuhópsins“ og notkun liðar 4.2.1.3.1.

4.2.1.3.1. Afleiðsla ökumótstöðu brúunarhóps frá ökumótstöðuhópi

Ákvarða skal ökumótstöðu H_R og/eða L_R í samræmi við þennan undirviðauka.

Ökumótstaða fyrir ökutæki H (og L) í brúunarhóp innan ökumótstöðuhópsins skal reiknuð út í samræmi við lið 3.2.3.2.2 til 3.2.3.2.2.4 í 7. undirviðauka, með því að:

a) Nota H_R og L_R í ökumótstöðuhópnum í stað þess að nota H og L sem ílagsgögn í jöfnur,

b) nota mæliþætti ökumótstöðu (þ.e. prófunarmassa, $\Delta(C_D \times A_f)$ samanborið við ökutæki L_R, og snúningsmótstöðu hjólbarða) ökutækis H (eða L) í brúunarhóp sem ílagsgögn fyrir einstakt ökutæki,

c) endurtaka þennan útreikning fyrir hvert ökutæki H og L í öllum brúunarhópum innan ökumótstöðuhópsins.

Brúun ökumótstöðu skal eingöngu beitt á þá eiginleika sem tengjast ökumótstöðu sem við greiningu reyndust ólíkir á milli prófunarökutækis L_R og H_R. Að því er varðar aðra viðkomandi eiginleika ökumótstöðu skal gildið fyrir ökutæki H_R gilda.

Ílagsgögn H og L í ökumótstöðuhópnum geta verið afleidd frá mismunandi ökumótstöðuhópum. Ef munurinn á milli þessara ökumótstöðuhópa er afleiðing þess að Delta-aðferð er notuð, sjá lið 4.2.1.2.3.4.“

m) Liðir 4.2.1.3.2, 4.2.1.3.3, 4.2.1.3.4 og 4.2.1.3.5 falla brott.

n) Í lið 4.2.1.8.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Að beiðni framleiðanda má nota ökutæki sem hefur verið keyrt a.m.k. 3000 km.“

o) Liður 4.2.1.8.1.1 fellur brott.

p) Í stað liðar 4.2.1.8.5 kemur eftirfarandi:

„4.2.1.8.5. Fríhjólunarhamur ökutækis

Ef ákvörðun stillinga vegkeflis uppfyllir ekki viðmiðanirnar sem lýst er í lið 8.1.3 eða 8.2.3 vegna ósamanburðarnákvæmra krafta, skal ökutækið búið fríhjólunarham. Viðurkenningaryfirvaldið skal viðurkenna fríhjólunarham ökutækisins og notkun hans skal tilgreind í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

Ef ökutæki er búið fríhjólunarham skal hann virkjaður bæði við ákvörðun ökumótstöðu og þegar ökutækið er á vegkeflinu.“

q) Liður 4.2.1.8.5.1 fellur brott.

r) Í stað liðar 4.2.2.1 kemur eftirfarandi:

„4.2.2.1. Snúningsmótstaða hjólbarða

Mæla skal snúningsmótstöðu hjólbarða í samræmi við 6. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 117 – röð breytinga nr. 02. Reiknistuðlar snúningsmótstöðu skulu samræmdir og flokkaðir í samræmi við snúningsmótstöðuflokkinn í reglugerð (EB) nr. 1222/2009 (sjá töflu A4/2).

Tafla A4/2

Orkunýtniflokkar í samræmi við veltiviðnámsstuðla (RRC) fyrir C1-, C2- og C3-hjólbarða og veltiviðnámsstuðlar sem nota á í tengslum við þá orkunýtniflokka við brúunina, kg/tonn

Orkunýtniflokkur	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C1-hjólbörðum	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C2-hjólbörðum	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C3-hjólbörðum
A	RRC = 5,9	RRC = 4,9	RRC = 3,5
B	RRC = 7,1	RRC = 6,1	RRC = 4,5
C	RRC = 8,4	RRC = 7,4	RRC = 5,5
D	Autt	Autt	RRC = 6,5

Orkunýtniflokkur	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C1-hjólbörðum	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C2-hjólbörðum	Gildi fyrir veltiviðnámsstuðla sem nota skal við brúun á C3-hjólbörðum
E	RRC = 9,8	RRC = 8,6	RRC = 7,5
F	RRC = 11,3	RRC = 9,9	RRC = 8,5
G	RRC = 12,9	RRC = 11,2	Autt

Nota skal raunveruleg gildi fyrir snúningsmótstöðu hjólbarða sem settir eru undir prófunarökutæki L og H sem ílag fyrir reikningsaðferðina ef brúunaraðferðin er notuð fyrir snúningsmótstöðu í þeim tilgangi að reikna út lið 3.2.3.2 í 7. undirviðauka. Nota skal gildið fyrir veltiviðnámsstuðla orkunýtniflokks hjólbarða á ökutæki í tengslum við einstök ökutæki innan brúunarhóps.

Í tilvikum þar sem hægt er að afhenda einstök ökutæki með heilu setti af venjulegum hjólum og hjólbörðum ásamt heilu setti af snjóhjólbörðum (með 3PMS-merkingu – fjall með þremur toppum og snjókorni (e. *3 Peaked Mountain and Snowflake*)) með eða án hjóla skulu viðbótarhjólin/-hjólbarðarnir ekki teljast sem valfrjáls búnaður.“

s) Í lið 4.2.2.2 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Að lokinni mælingu á mynsturdýpt skal keyrslan takmörkuð við 500 km. Ef keyrt er yfir 500 km skal mynsturdýptin mæld aftur.“

t) Liður 4.2.2.2.1 fellur brott.

u) Ákvæðum liðar 4.2.4.1.2 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrstu málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina kemur eftirfarandi:

„Öllum ökutækjum skal ekið á hraða sem nemur 90% af hámarkshraða viðeigandi WLTC-prófunarlotu. Ökutækið skal hitað upp í a.m.k. 20 mínútur þar til stöðugum skilyrðum er náð.“

ii. Í stað töflu A4/2 kemur eftirfarandi:

„*Tafla A4/3*

Frátekið“.

v. Í stað liða 4.3.1.1 og 4.3.1.2 kemur eftirfarandi:

„4.3.1.1. Val á viðmiðunarhraða við ákvörðun ökumótstöðuferilsins

Viðmiðunarsnúningshraði við ákvörðun ökumótstöðu skal valinn í samræmi við lið 2.2.

Meðan á prófun stendur skal mæla liðinn tíma og hraða ökutækis á tíðni sem nemur a.m.k. 10 Hz.“

w) Í stað liða 4.3.1.3.3 og 4.3.1.3.4 kemur eftirfarandi:

„4.3.1.3.3. Prófunin skal endurtekin þar til að gögn um fríhjólun uppfylla kröfur um tölfræðilega nákvæmni eins og tilgreint er í lið 4.3.1.4.2.

4.3.1.3.4. Þó að mælt sé með að hver fríhjólunarkeyrsla skuli gerð án truflunar er leyfilegt að skipta prófunarkeyrslu niður ef ekki er mögulegt að safna gögnum í einni keyrslu fyrir alla viðmiðunarhraðapunktana. Eftirfarandi viðbótarkröfur gilda fyrir prófunarkeyrslur sem er skipt niður:

a) Gæta skal þess að ástand ökutækisins haldist eins stöðugt og hægt er við hvern skiptipunkt,

b) minnst einn hraðapunktur skal skarast við hærra hraðasvið fríhjólunar,

c) við hvern hraðapunkt sem skarast skal meðalkraftur lægra hraðasviðs fríhjólunar ekki víkja frá meðalkrafti hærra hraðasviðs fríhjólunar sem nemur ±10 N eða ±5%, hvor talan sem er hærri,

d) ef lengd prófunarbrautar dugar ekki til að uppfylla kröfuna í b-lið í þessum lið skal bæta við einum hraðapunkti til viðbótar sem gegnir hlutverki hraðapunkts sem skarast.“

x) Í stað liða 4.3.1.4 til 4.3.1.4.4 kemur eftirfarandi:

„4.3.1.4. Mæling á fríhjólunartíma

4.3.1.4.1. Mæla skal fríhjólunartímann sem samsvarar viðmiðunarhraða v_j sem mælitíma frá hraða ökutækisins (v_j + 5 km/klst.) til (v_j – 5 km/klst.).

4.3.1.4.2. Þessar mælingar skulu gerðar í gagnstæðar áttir þar til fengist hafa að lágmarki þrjár mælingar sem uppfylla tölfræðilega nákvæmni p_j, sem er skilgreind í eftirfarandi jöfnu:

$$p_j = \frac{h \times \sigma_j}{\sqrt{n} \times \Delta t_{pj}} \leq 0{,}030$$

þar sem:

p_j er tölfræðileg nákvæmni mælinga sem eru gerðar á viðmiðunarhraða v_j,

n er fjöldi mælingapara,

Δt_{pj} er þýtt meðaltal fríhjólunartíma á viðmiðunarhraða v_j í sekúndum, fundið með eftirfarandi jöfnu:

$$\Delta t_{pj} = \frac{n}{\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{\Delta t_{ji}}}$$

þar sem:

Δt_{ji} er þýtt meðaltal fríhjólunartíma i-unda mælingapars á hraða v_j, í sekúndum, fundið með eftirfarandi jöfnu:

$$\Delta t_{ji} = \frac{2}{\left(\frac{1}{\Delta t_{jai}}\right) + \left(\frac{1}{\Delta t_{jbi}}\right)}$$

þar sem:

Δt_{jai} og Δt_{jbi} eru fríhjólunartímar i-undu mælingar á viðmiðunarhraða v_j, í sekúndum, í áttir a og b,

σ_j er staðalfrávik, gefið upp í sekúndum, skilgreint með:

$$\sigma_j = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} \left(\Delta t_{ji} - \Delta t_{pj}\right)^2}$$

h er fráviksstuðull sem er tilgreindur í töflu A4/4.

TableA4/4

Stuðull h sem fall af n

n	h	n	h
3	4,3	17	2,1
4	3,2	18	2,1

n	h	n	h
5	2,8	19	2,1
6	2,6	20	2,1
7	2,5	21	2,1
8	2,4	22	2,1
9	2,3	23	2,1
10	2,3	24	2,1
11	2,2	25	2,1
12	2,2	26	2,1
13	2,2	27	2,1
14	2,2	28	2,1
15	2,2	29	2,0
16	2,1	30	2,0

4.3.1.4.3. Ef utanaðkomandi þáttur eða aðgerð ökumanns á sér stað meðan mæling í eina átt stendur yfir sem hefur augljós áhrif á ökumótstöðuprófun, skal þeirri mælingu og samsvarandi mælingu í gagnstæða átt hafnað. Skrá skal öll gögn sem var hafnað ásamt ástæðu þess að þeim er hafnað og fjöldi þeirra mælingapara sem er hafnað skal ekki fara yfir 1/3 af heildarfjölda mælingapara. Meta skal hámarksfjölda mælingapara sem uppfylla áfram tölfræðilegu nákvæmnina eins og hún er skilgreind í lið 4.3.1.4.2. Ef útiloka á mælingarpör skal fyrst útiloka þau mælingapör sem hafa hámarksfrávik frá meðaltalinu.

4.3.1.4.4. Eftirfarandi jafna skal notuð við útreikning á meðalgildi ökumótstöðu ef notast er við þýtt meðaltal varafríhjólunartíma.

$$F_j = \frac{1}{3{,}6} \times (m_{av} + m_r) \times \frac{2 \times \Delta v}{\Delta t_j}$$

þar sem:

Δt_j er þýtt meðaltal mælinga á varafríhjólunartíma við hraða v_j, í sekúndum, gefið upp sem:

$$\Delta t_j = \frac{2}{\frac{1}{\Delta t_{ja}} + \frac{1}{\Delta t_{jb}}}$$

þar sem:

Δt_{ja} og Δt_{jb} eru þýtt meðaltal fríhjólunartíma í stefnu a og b, eftir því sem við á, sem samsvara viðmiðunarhraða v_j, í sekúndum s, gefin upp með eftirfarandi tveimur jöfnum:

$$\Delta q_{ja} = \frac{n}{\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{t_{jai}}}$$

og:

$$\Delta n_{jb} = \frac{n}{\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{t_{jbi}}}.$$

þar sem:

m_{av} er meðalgildi massa prófunarökutækis við upphaf og í lok ákvörðunar ökumótstöðu, í kg,

m_r er samsvarandi virkur massi snúningsíhluta í samræmi við lið 2.5.1.“

Reikna skal stuðlana f_0, f_1 og f_2 í ökumótstöðujöfnunni með aðhvarfsgreiningu minnstu fervika.

Ef prófað ökutæki er dæmigert ökutæki fyrir ökumótstöðufylkjahóp skal stuðullinn f_1 stilltur á núll og skulu stuðlarnir f_0 og f_2 endurreiknaðir með aðhvarfsgreiningu minnstu fervika.“

y) Í stað liðar 4.3.2.3 kemur eftirfarandi:

„4.3.2.3. Gagnaöflun

Meðan á gagnasöfnun stendur skal mæla liðinn tíma, hraða ökutækis og lofthraða (vindhraða og vindátt) miðað við ökutækið, með 5 Hz lágmarkstíðni. Umhverfishiti skal samstilltur og mældur á 0,1 Hz lágmarkstíðni.“

z) Í stað liðar 4.3.2.4.3 kemur eftirfarandi:

„4.3.2.4.3. Þó að mælt sé með að hver fríhjólunarkeyrsla skuli gerð án truflunar er leyfilegt að skipta prófunarkeyrslu niður ef ekki er mögulegt að safna gögnum í einni keyrslu fyrir alla viðmiðunarhraðapunktana. Eftirfarandi viðbótarkröfur gilda fyrir prófunarkeyrslur sem er skipt niður:

a) Gæta skal þess að ástand ökutækisins haldist eins stöðugt og hægt er við hvern skiptipunkt,

b) hærra hraðasvið fríhjólunar skal a.m.k. skarast við einn hraðapunkt,

c) við hvern hraðapunkt eða hraðapunkta sem skarast skal meðalkraftur lægra hraðasviðs fríhjólunar ekki bregða frá meðalkrafti hærra hraðasviðs fríhjólunar um sem nemur ±10 N eða ±5%, hvor talan sem er hærri,

d) ef lengd prófunarbrautar dugar ekki til að uppfylla kröfuna í b-lið í þessum lið skal bæta við einum hraðapunkti til viðbótar sem gegnir hlutverki hraðapunkts sem skarast.“

aa) Lið 4.3.2.5 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrstu málsgreinar eftir fyrirsögn liðar 4.3.2.5 kemur eftirfarandi:

„Tákn sem eru notuð í hreyfijöfnum innbyggðs vindmælis eru talin upp í töflu A4/5.“

ii. Númerabreyting er gerð á töflu A4/4 og í staðinn er vísað til töflu A4/5.

iii. Í töflunni er eftirfarandi línu bætt við á eftir röðina m_{av}:

„m_e kg virk tregða ökutækis, þ.m.t. snúningsíhluta.“

ab) Í stað liðar 4.3.2.5.1 kemur eftirfarandi:

„4.3.2.5.1. Almennt snið

Almennt snið hreyfijafna skal vera eftirfarandi:

$$-m_e\left(\frac{d_v}{d_t}\right) = D_{mech} + D_{aero} + D_{grav}$$

þar sem:

$D_{mech} = D_{tyre} + D_f + D_r$;

$$D_{aero} = \left(\frac{1}{2}\right) \rho C_D(Y) A_f v_r^2,$$

$$D_{grav} = m \times g \times \left(\frac{dh}{ds}\right)$$

Ef halli prófunarbrautarinnar er jafn mikill eða innan við 0,1% yfir lengd hennar, má stilla gildi fyrir D_{grav} á núll.“

ac) Í stað jöfnunnar í lið 4.3.2.5.4 kemur eftirfarandi:

„ $-m_e\left(\frac{dv}{dt}\right) = A_m + B_m v + C_m v^2 + \left(\frac{1}{2}\right) \times \rho \times A_f \times v_r^2(a_0 + a_1 Y + a_2 Y^2 + a_3 Y^3 + a_4 Y^4) + \left(m \times g \times \frac{dh}{ds}\right)$ “.

ad) Í stað liðar 4.3.2.6.3 kemur eftirfarandi:

„4.3.2.6.3. Bráðabirgðagreining

Með línulegri aðhvarfsgreiningu minnstu fervika, skal greina alla gagnapunkta samtímis til að ákvarða A_m, B_m, C_m, a_0, a_1, a_2, a_3 og a_4, og tilgreind gildi fyrir m_e, $\left(\frac{dh}{ds}\right)$, $\left(\frac{dv}{dt}\right)$, v, v_r, and ρ.“

ae) Í stað liðar 4.3.2.6.7 kemur eftirfarandi:

„4.3.2.6.7. Lokagreining gagna

Greina skal öll gögn sem hafa ekki verið merkt með línulegri aðhvarfsgreiningu minnstu fervika. Ákvarða skal A_m, B_m, C_m, a_0, a_1, a_2, a_3 and a_4 og tilgreind gildi fyrir m_e, $\left(\frac{dh}{ds}\right)$, $\left(\frac{dv}{dt}\right)$, v, v_r, og ρ.“

af) Í stað liðar 4.4.1 kemur eftirfarandi:

„4.4.1. Uppsetning snúningsvægismælis

Mælar fyrir snúningsvægi hjóla skulu settir upp milli hjólnafar og hjólsins á hverju drifhjóli í því skyni að mæla það snúningsvægi sem nauðsynlegt er til að halda ökutækinu á stöðugum hraða.

Snúningsvægismælir skal kvarðaður reglulega, a.m.k. einu sinni á ári, og kvörðunin skal vera rekjanleg til landsbundinna eða alþjóðlegra staðla svo þeir uppfylli kröfur um nákvæmni og samkvæmni.“

ag) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á lið 4.4.2.4:

i. Í fyrstu málsgrein á eftir fyrirsögninni, í stað orðanna „Tafla A4/5“ koma orðin „Tafla A4/6“.

ii. Í fyrirsagnar töflunnar, í stað orðanna „Tafla A4/5“ koma orðin „Tafla A4/6“.

ah) Textanum í lið 4.4.3.2:

„h er stuðull sem fall af n eins og tilgreint er í töflu A4/3 í lið 4.3.1.4.2 í þessum undirviðauka.“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„h er stuðull sem fall af n eins og tilgreint er í töflu A4/4 í lið 4.3.1.4.2 í þessum undirviðauka.“

ai) Í stað inngangshlutans í fyrstu málsgrein fyrir neðan fyrirsögnina í lið 4.4.4 kemur eftirfarandi:

„Meðalgildi hraða ökutækis og meðalgildi snúningsvægis á hverjum viðmiðunarhraðapunkti skal reiknað út með eftirfarandi jöfnum:“

aj) Í stað liðar 4.5.3.1.1 kemur eftirfarandi:

„4.5.3.1.1. Leiðrétting á raunvindhraða meðfram prófunarakbrautinni er gerð með því að draga frá mismuninn sem ekki er mögulegt að fella út með gagnstæðri keyrslu frá stuðlinum f_0 sem er ákvarðaður í samræmi við lið 4.3.1.4.4 eða frá reiknistuðlinum c_0 sem er ákvarðaður í samræmi við lið 4.4.4.“

ak) Í stað línunnar fyrir „m_{av}“ í lið 4.5.4 kemur eftirfarandi:

„m_{av} er meðalgildi massa prófunarökutækis við upphaf og í lok ákvörðunar ökumótstöðu, í kg.“

al) Í stað línanna fyrir „f_1“ og „f_2“ í lið 4.5.5.1 kemur eftirfarandi:

„f_1 er stuðull fyrir fyrstu gráðu liðinn, í N/(km/klst.),

f_2 er stuðull fyrir annarrar gráðu liðinn, í $N/(km/klst.)^2$,“.

am) Í stað línanna fyrir „c1“ og „c2“ í lið 4.5.5.2.1 kemur eftirfarandi:

„c_1 er stuðull fyrir fyrstu gráðu liðinn, ákvarðaður í lið 4.4.4, í Nm/(km/klst.),

c_2 er stuðull fyrir annarrar gráðu liðinn, ákvarðaður í lið 4.4.4, í $Nm/(km/klst.)^2$,“.

an) Í stað liðar 5.1.1.1 kemur eftirfarandi:

„5.1.1.1. Reikna skal út ökumótstöðukraft fyrir einstakt ökutæki með eftirfarandi jöfnu:

$$F_c = f_0 + (f_1 \times v) + (f_2 \times v^2)$$

þar sem:

F_c er reiknaður ökumótstöðukraftur sem fall af hraða ökutækis, í N,

f_0 er fastur ökumótstöðustuðull, í N, skilgreindur með jöfnunni:

$$f_0 = \mathrm{Max}\left(\left(0{,}05 \times f_{0r} + 0{,}95 \times \left(f_{0r} \times \frac{TM}{TM_r} + \left(\frac{RR - RR_r}{1\,000}\right) \times 9{,}81 \times TM\right)\right), \left(0{,}2 \times f_{0r} + 0{,}8 \times \left(f_{0r} \times TM/TM_r + \left(\frac{RR - RR_r}{1\,000}\right) \times 9{,}81 \times TM\right)\right)\right)$$

f_{0r} er fastur ökumótstöðustuðull fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í N,

f_1 er fyrsta stigs ökumótstöðustuðull í N/(km/klst.) og skal hann stilltur á núll,

f_2 er annars stigs ökumótstöðustuðull, í $N/(km/klst.)^2$, skilgreindur með eftirfarandi jöfnu:

$$f_2 = \mathrm{Max}((0{,}05 \times f_{2r} + 0{,}95 \times f_{2r} \times A_f/A_{fr}), (0{,}2 \times f_{2r} + 0{,}8 \times f_{2r} \times A_f/A_{fr}))$$

f_{2r} er annars stigs ökumótstöðustuðull fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í $N/(km/klst.)^2$,

v er hraði ökutækis, í km/klst.,

TM er raunverulegur prófunarmassi fyrir einstakt ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í kg,

TM_r er prófunarmassi fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í kg,

A_f er framhlið einstaks ökutækis í ökumótstöðufylkjahópi, í m^2,

A_{fr} er framhlið dæmigerðs ökutækis í ökumótstöðufylkjahópi, í m^2,

RR er snúningsmótstaða hjólbarða fyrir einstakt ökutæki í ökumótstöðufylkjahópnum, í kg/tonn,

RR_r er snúningsmótstaða hjólbarða fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópnum, kg/tonn.

Fyrir hjólbarða sem settir eru undir einstök ökutæki skulu gildi snúningsmótstöðu RR stillt á gildi fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2.

Ef hjólbarðarnir á fram- og afturásum tilheyra mismunandi orkunýtniflokkum skal nota vegið meðaltal sem er reiknað út með jöfnunni í lið 3.2.3.2.2.2 í 7. undirviðauka.

Ef sömu hjólbörðunum var komið fyrir á prófunarökutækjum L og H skal gildið fyrir RR_{ind} stillt á RR_H þegar brúunaraðferðin er notuð.“

ao) Í stað liðar 5.1.2.1 kemur eftirfarandi:

„5.1.2.1. Reikna skal út ökukraftvægi fyrir einstakt ökutæki með eftirfarandi jöfnu:

$$C_c = c_0 + c_1 \times v + c_2 \times v^2$$

þar sem:

C_c er reiknað ökukraftvægi sem fall af hraða ökutækis, í Nm,

c_0 er fastur ökukraftvægisstuðull, í Nm, skilgreindur með jöfnunni:

$$c_0 = r'/1{,}02 \times \mathrm{Max}\left(\begin{array}{l}\left(0{,}05 \times 1{,}02 \times \frac{c_{0r}}{r'} + 0{,}95 \times \left(1{,}02 \times \frac{c_{0r}}{r'} \times \frac{TM}{TM_r} + \left(\frac{RR - RR_r}{1\,000}\right) \times 9{,}81 \times TM\right)\right), \\ \left(0{,}2 \times 1{,}02 \times c_{0r}/r' + 0{,}8 \times \left(1{,}02 \times c_{0r}/r' \times TM/TM_r + \left(\frac{RR - RR_r}{1\,000}\right) \times 9{,}81 \times TM\right)\right)\end{array}\right)$$

c_{0r} er fastur ökukraftvægisstuðull fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í Nm,

c_1 er fyrsta stigs ökumótstöðustuðull í Nm/(km/klst.) og skal hann stilltur á núll,

c_2 er annars stigs ökukraftvægisstuðull, í Nm/(km/klst.)^2, skilgreindur með jöfnunni:

$$c_2 = r'/1{,}02 \times \mathrm{Max}((0{,}05 \times 1{,}02 \times c_{2r}/r' + 0{,}95 \times 1{,}02 \times c_{2r}/r' \times A_f/A_{fr}); (0{,}2 \times 1{,}02 \times c_{2r}/r' + 0{,}8 \times 1{,}02 \times c_{2r}/r' \times A_f/A_{fr}))$$

c_{2r} er annars stigs ökukraftvægisstuðull fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í N/(km/klst.)^2,

v er hraði ökutækis, í km/klst.,

TM er raunverulegur prófunarmassi fyrir einstakt ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í kg,

TMr er prófunarmassi fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi, í kg,

A_f er framhlið einstaks ökutækis í ökumótstöðufylkjahópi, í m^2,

A_{fr} er framhlið dæmigerðs ökutækis í ökumótstöðufylkjahópi, í m^2,

RR er snúningsmótstaða hjólbarða fyrir einstakt ökutæki í ökumótstöðufylkjahópnum, í kg/tonn,

RR_r er snúningsmótstaða hjólbarða fyrir dæmigert ökutæki í ökumótstöðufylkjahópnum, í kg/tonn,

r′ er snúningsradíus hjólbarðans á vegkeflinu á 80 km/klst., í m,

1,02 er nálgunarstuðull sem bætir upp fyrir núningstap drifrásar.“

ap) Í stað línanna „f_1“ og „f_2“ í lið 5.2.2 kemur eftirfarandi:

„f_1 er fyrsta stigs ökumótstöðustuðull í N/(km/klst.) og skal hann stilltur á núll,

f_2 er annars stigs ökumótstöðustuðull, í N/(km/klst.)^2, ákvarðaður með því að nota eftirfarandi jöfnu:

$$f_2 = (2{,}8 \times 10^{-6} \times TM) + (0{,}0170 \times \text{breidd} \times \text{hæð}),“.$$

aq) Eftirfarandi málsgrein bætist við í b-lið liðar 6.2.4 á eftir jöfnunni:

„Viðurkenningaryfirvaldið skal skrá viðurkenninguna að meðtöldum gögnum úr mælingum og viðkomandi starfsstöðvum.“

ar) Í stað fyrstu málsgreinar í lið 6.4.1 kemur eftirfarandi:

„Hönnun vindganga, prófunaraðferðir og leiðréttingar skulu gefa af sér gildi fyrir ($C_D \times A_f$) sem er dæmigert fyrir gildi ($C_D \times A_f$) í akstri og með ±0,015 m^2 nákvæmni.“

as) Í stað annarrar og þriðju málsgreinar fyrir neðan fyrirsögnina í lið 6.4.2 kemur eftirfarandi:

„Ökutækinu skal komið fyrir samsíða lengdarmiðlínu ganganna með vikmörk að hámarki ±10 mm.

Ökutækinu skal komið fyrir með 0° geighorn innan fráviks sem nemur ±0,1°.“

at) Í stað liðar 6.5.1.6 kemur eftirfarandi:

„6.5.1.6. Kæling

Blása skal lofti í áttina að ökutækinu á breytilegum hraða. Þegar mælihraði er yfir 5 km/klst. skal stillipunktur línulegs lofthraða við úttak blásarans jafngilda tilsvarandi aflmælishraða. Línulegur lofthraði við úttak blásarans skal haldast innan ±5 km/klst. eða ±10% af tilsvarandi mælihraða, hvor talan sem er hærri.“

au) Í stað liðar 6.5.2.3.2 kemur eftirfarandi:

„Mælingin skal gerð samkvæmt liðum 4.3.1.3.1 til 4.3.1.4.4 í þessum undirviðauka. Ef fríhjólun er ekki möguleg í gagnstæðar áttir þá gildir jafnan sem notuð er við útreikning á Δt_{ji} í lið 4.3.1.4.2 í þessum undirviðauka ekki. Mælingin skal stöðvuð eftir tvær hraðaminnkanir ef kraftur beggja fríhjólana á hverjum viðmiðunarhraðapunkti er innan við ±10 N; að öðrum kosti skal framkvæma a.m.k. þrjár fríhjólanir með viðmiðununum sem settar eru fram í lið 4.3.1.4.2 í þessum undirviðauka.“

av) Önnur málsgreinin undir fyrirsögninni í lið 6.5.2.4 fellur brott.

aw) Í stað liðar 6.6.1.1 kemur eftirfarandi:

„6.6.1.1. Lýsing á vegkefli

Fram- og afturásar skulu búnir einu kefli sem er a.m.k. 1,2 metrar að þvermáli.“

ax) Í stað liðar 6.6.1.5 kemur eftirfarandi:

„6.6.1.5. Yfirborð keflis

Yfirborð keflis skal vera hreint, þurrt og laust við allt sem getur valdið því að hjólbarðinn renni til.“

ay) Í stað liðar 6.6.3 kemur eftirfarandi:

„6.6.3. Mældir kraftar á vegkefli leiðréttir að þeim sem eru á sléttum fleti

Mældir kraftar á vegkefli skulu leiðréttir að viðmiðun sem jafngildir vegyfirborði (sléttu) og skal vísað til niðurstöðunnar sem f_j.

$$c_j = f_{jDyno} \times c1 \times \sqrt{\frac{1}{\frac{R_{wheel}}{R_{Dyno}} \times c2 + 1}} + f_{jDyno} \times (1 - c1)$$

þar sem:

c1 er snúningsmótstaða hjólbarða sem brot af f_{jDyno},

c2 er sértækur radíusleiðréttingarstuðull fyrir vegkefli,

f_{jDyno} er krafturinn sem er reiknaður út í lið 6.5.2.3.3 fyrir hvern viðmiðunarhraða j, í N,

R_{Wheel} er helmingur af nafnþvermáli hjólbarða eins og hann er hannaður, í m,

R_{Dyno} er radíus vegkeflis, í m.

Framleiðandi og viðurkenningaryfirvald skulu koma sér saman um hvaða stuðla skuli nota fyrir c1 og c2, á grundvelli gagna úr prófun framleiðanda á samsvörun allra eiginleika hjólbarða sem ætlunin er að prófa á vegkeflinu.

Að öðrum kosti má nota eftirfarandi varfærna jöfnu:

$$f_j = f_{jDyno} \times \sqrt{\frac{1}{\frac{R_{Wheel}}{R_{Dyno}} \times 0{,}2 + 1}}$$

C2 skal vera 0,2 nema að hafa skal 2,0 ef notuð er Delta-aðferð fyrir ökumótstöðu (sjá lið 6.8) og Delta fyrir ökumótstöðu sem er reiknað út í samræmi við lið 6.8.1 er neikvæður.“

az) Eftirfarandi liðir 6.8, 6.8.1 og 6.8.2 bætast við:

„6.8. Delta-aðferð fyrir ökumótstöðu

Í þeim tilgangi að taka með valfrjálsan búnað við notkun brúunaraðferðarinnar sem er ekki tekinn með í brúun á ökumótstöðu (þ.e. loftaflfræðilega eiginleika, snúningsmótstöðu og massa) er hægt að mæla Delta í núningi ökutækis með Delta-aðferðinni fyrir ökumótstöðu (t.d. núningsmun milli hemlakerfa). Framkvæma skal eftirfarandi þrep:

a) Mæla skal núning viðmiðunarökutækis R,

b) mæla skal núning ökutækisins sem hefur valfrjálsan búnað (ökutæki N) sem veldur núningsmuninum,

c) reikna skal út muninn í samræmi við lið 6.8.1.

Þessar mælingar skulu gerðar á flatreim í samræmi við lið 6.5 eða á vegkefli í samræmi við lið 6.6 og leiðréttingá á niðurstöðum (að frátöldum loftaflfræðilega kraftinum) reiknuð út í samræmi við lið 6.7.1.

Notkun þessarar aðferðar er einungis leyfileg ef eftirfarandi viðmiðun er uppfyllt:

$$\left|\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\left(F_{Dj,R} - F_{Dj,N}\right)\right| \leq 25\ N$$

þar sem:

$F_{Dj,R}$ er leiðrétt mótstaða ökutækis R sem mæld er á flatreim eða vegkefli á viðmiðunarhraða j reiknað út í samræmi við lið 6.7.1, í N,

$F_{Dj,R}$ er leiðrétt mótstaða ökutækis N sem mæld er á flatreim eða vegkefli á viðmiðunarhraða j reiknað út í samræmi við lið 6.7.1, í N,

n er heildarfjöldi hraðapunkta.

Þessa staðgönguaðferð fyrir ákvörðun ökumótstöðu má einungis nota ef ökutæki R og N hafa eins loftnúningsviðnám og ef það Delta sem mælt er inniheldur öll áhrifin á orkunotkun ökutækisins. Þessa aðferð skal ekki nota ef heildarnákvæmni raunökumótstöðu ökutækis N er á einhvern hátt skert.

6.8.1. Ákvörðun á Delta-stuðlum fyrir flatreim eða vegkefli

Reikna skal út Delta fyrir ökumótstöðu með eftirfarandi jöfnu:

$F_{Dj,Delta} = F_{Dj,N} - F_{Dj,R}$

þar sem:

$F_{Dj,Delta}$ er Delta fyrir ökumótstöðu á viðmiðunarhraða j, í N,

$F_{Dj,R}$ er leiðrétt mótstaða ökutækis N sem mæld er á flatreim eða vegkefli á viðmiðunarhraða j reiknað út í samræmi við lið 6.7.1, í N,

$F_{Dj,R}$ er leiðrétt mótstaða viðmiðunarökutækisins sem mæld er á flatreim eða vegkefli á viðmiðunarhraða j reiknað út fyrir viðmiðunarökutæki R í samræmi við lið 6.7.1, í N.

Fyrir öll útreiknuð $F_{DJ,Delta}$ gildi skal reikna út stuðlana $f_{0,Delta}$, $f_{1,Delta}$ og $f_{2,Delta}$ í ökumótstöðujöfnunni með aðhvarfsgreiningu minnstu fervika.

6.8.2. Ákvörðun á heildarökumótstöðu

Ef brúunaraðferðin (sjá lið 3.2.3.2 í 7. undirviðauka) er ekki notuð skal reikna út Delta fyrir ökumótstöðu ökutækis N í samræmi við eftirfarandi jöfnur:

$$f_{0,N} = f_{0,R} + f_{0,Delta}$$

$$f_{1,N} = f_{1,R} + f_{1,Delta}$$

$$f_{2,N} = f_{2,R} + f_{2,Delta}$$

þar sem:

N vísar til ökumótstöðustuðla fyrir ökutæki N,

R vísar til ökumótstöðustuðla viðmiðunarökutækis R,

Delta vísar til Deltastuðla ökumótstöðu sem eru ákvarðaðir í lið 6.8.1.“

ba) eftirfarandi liður 7.1.0. bætist við:

„7.1.0. Val á drifham vegkeflis

Prófunin skal gerð á annaðhvort vegkefli í tvíhjóladrifsham eða vegkefli í fjórhjóladrifsham í samræmi við lið 2.4.2.4 í 6. undirviðauka.“

bb) Í stað liðar 7.1.1.1 kemur eftirfarandi:

„7.1.1.1. Kefli

Kefli vegkeflisins skulu vera hrein, þurr og laus við allt sem getur valdið því að hjólbarðar renni til. Keyra skal vegkeflið á sömu tengdu eða aftengdu stillingu og við prófun 1 sem á eftir kemur. Hraði vegkeflis skal mældur við keflið sem er tengt við aflgleypandi eininguna.“

bc) Í stað liðar 7.3.2 kemur eftirfarandi:

„7.3.2. Ef ákvörðun stillinga vegkeflis uppfyllir ekki viðmiðanirnar sem lýst er í lið 8.1.3 vegna ósamanburðarnákvæmra krafta, skal ökutækið búið fríhjólunarham. Viðurkenningaryfirvald skal viðurkenna fríhjólunarham ökutækisins og notkun hans skal tilgreind í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

Ef ökutæki er búið fríhjólunarham skal hann virkjaður bæði við ákvörðun ökumótstöðu og þegar ökutækið er á vegkeflinu.“

bd) Liður 7.3.2.1 fellur brott.

be) Í stað liða 7.3.3 og 7.3.3.1 kemur eftirfarandi:

„7.3.3. Staðsetning ökutækis á vegkeflinu

Prófaða ökutækinu skal komið fyrir á vegkeflinu þannig að það vísi beint fram og það skal fest á öruggan hátt. Ef notað er vegkefli með einu kefli skal miðjan á snertifleti hjólbarða við keflið vera innan við ±25 mm eða ±2% af þvermáli keflis, eftir því hvor talan er lægri, frá efri brún keflis.

Ef aðferðin með snúningsvægismælinum er notuð skal þrýstingur í hjólbörðunum stilltur þannig að snúningsradíusinn sé innan við 0,5% af snúningsradíusnum r_j sem reiknaður er út með jöfnunni í lið 4.4.3.1 við 80 km viðmiðunarhraða á klukkustund. Snúningsradíus á vegkeflinu skal reiknaður út í samræmi við aðferðina sem lýst er í lið 4.4.3.1.

Ef þrýstingsstillingin liggur utan sviðsins sem skilgreint er í lið 7.3.1 gildir snúningsvægismæliaðferðin ekki.

7.3.3.1. [Frátekið til notkunar síðar]“.

bf) Í stað liðar 7.3.4.1 og töflu A4/6 kemur eftirfarandi:

„7.3.4.1. Ökutæki skal hitað upp með viðeigandi WLTC-prófunarlotu.“

bg) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á a-lið liðar 8.1.1:

i. Í stað textans „$A_d = 0,5 \times A_t$, $B_d = 0,2 \times B_t$, $C_d = C_t$“

kemur eftirfarandi:

„$A_d = 0,5 \times A_t$, $B_d = 0,2 \times B_t$, $C_d = C_t$“

ii. Í stað textans „$A_d = 0,1 \times A_t$, $B_d = 0,2 \times B_t$, $C_d = C_t$“

kemur eftirfarandi:

„$A_d = 0,5 \times A_t$, $B_d = 0,2 \times B_t$, $C_d = C_t$“.

bh) Í stað línunnar fyrir „A_t, B_t og C_t“ í lið 8.1.3.1 kemur eftirfarandi:

„A_t, B_t og C_t eru markgildi fyrir ökumótstöðu“.

bi) Í stað fyrstu málsgreinar í lið 8.1.3.3 kemur eftirfarandi:

„Ökumótstöðuhermun á vegkefli skal reiknuð út í samræmi við aðferðina eins og tilgreint er í lið 4.3.1.4, að undanskilinni mælingu í gagnstæðar áttir:

$$F_s = A_s + B_s \times v + C_s \times v^2\text{“}.$$

bj) Í stað línunnar fyrir „A_t, B_t og C_t“ í lið 8.1.3.4.1.2 kemur eftirfarandi:

„A_t, B_t og C_t eru markgildi fyrir ökumótstöðu“.

bk) Í stað liðar 8.1.3.4.2 kemur eftirfarandi:

„8.1.3.4.2. Ítrunaraðferð

Reiknaðir kraftar á tilgreindu hraðasviði skulu annaðhvort vera innan við ±10 N að lokinni aðhvarfsgreiningu minnstu fervika á kröftum tveggja samfelldra fríhjólunarkeyrslna, samanborið við markgildin, eða að öðrum kosti skal framkvæma viðbótarfríhjólanir eftir leiðréttingu á álagsstillingu vegkeflis í samræmi við lið 8.1.4, þar til vikmörkum er náð.“

bl) eftirfarandi liður 8.1.5. bætist við:

„8.1.5. Nota skal A_t, B_t og C_t sem endanleg gildi fyrir f_0, f_1 og f_2 og þau skulu notuð í eftirfarandi tilgangi:

a) Við ákvörðun niðurskölunar, 8. liður 1. undirviðauka,

b) við ákvörðun gírskiptingarpunkta, 2. undirviðauki,

c) við brúun koltvísýrings og eldsneytisnotkunar, liður 3.2.3 í 7. undirviðauka,

d) við útreikning niðurstaðna fyrir rafökutæki og tvinnrafökutæki, 4. liður 8. undirviðauka.“

bm) Í stað orðanna „liður 4.4.3“ í fyrstu málsgrein í lið 8.2.3.2 koma orðin „liður 4.4.3.2.“

bn) Í stað liðar 8.2.3.3 kemur eftirfarandi:

„8.2.3.3. Leiðrétting

Álagsstilling vegkeflis skal leiðrétt með eftirfarandi jöfnu:

$$F*_{dj} = F_{dj} - \frac{F_{ej}}{r'} = F_{dj} - \frac{F_{sj}}{r'} + \frac{F_{tj}}{r'} = \left(A_d + B_d v_j + C_d v_j^2\right) - \frac{\left(a_s + b_s v_j + c_s v_j^2\right)}{r'} + \frac{\left(a_t + b_t v_j + c_t v_j^2\right)}{r'}$$
$$= \left\{A_d + \frac{(a_t - a_s)}{r'}\right\} + \left\{B_d + \frac{(b_t - b_s)}{r'}\right\} v_j + \left\{C_d + \frac{(c_t - c_s)}{r'}\right\} v_j^2$$

Þar af leiðandi gildir eftirfarandi:

$$A*_d = A_d + \frac{a_t - a_s}{r'}$$

$$B*_d = B_d + \frac{b_t - b_s}{r'}$$

$$C*_d = C_d + \frac{c_t - c_s}{r'}$$

þar sem:

$F*_{dj}$	er ný álagstilling vegkeflis, í N,
F_{ej}	er ökumótstöðuleiðrétting sem samsvarar ($F_{sj} - F_{tj}$), í Nm,
F_{sj}	er hermun ökumótstöðu á viðmiðunarsnúningshraða v_j, í Nm,
F_{tj}	er markgildi ökumótstöðu á viðmiðunarsnúningshraða v_j, í Nm,
$A*_d$, $B*_d$ og $C*_d$	eru nýir stuðlar fyrir stillingu vegkeflis,
r'	er snúningsradíus hjólbarðans á vegkeflinu á 80 km/klst., í m.

Endurtaka skal liði 8.2.2 og 8.2.3 þar til vikmörkunum í lið 8.2.3.2 er náð.“

bo) Í stað liðar 8.2.4.1 kemur eftirfarandi:

„8.2.4.1 Ef fríhjólun ökutækisins er ekki framkvæmd á endurtakanlegan hátt og ef ekki er gerlegt að beita fríhjólunarham ökutækis í samræmi við lið 4.2.1.8.5, skulu stuðlarnir f_0, f_1 og f_2 í ökumótstöðujöfnunni reiknaðir með jöfnunum í lið 8.2.4.1.1. Í öllum öðrum tilvikum skal fylgja aðferðinni sem lýst er í lið 8.2.4.2 til 8.2.4.4.“

bp) Í stað d-liðar í lið 8.2.4.1.2 kemur eftirfarandi:

„d) við útreikning niðurstaðna fyrir rafökutæki og tvinnrafökutæki, 4. liður 8. undirviðauka.“

30) Ákvæðum 5. undirviðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað liðar 1.1.1 kemur eftirfarandi:

„1.1.1. Blása skal lofti í átt að ökutækinu með breytilegum hraða. Þegar keflahraði er yfir 5 km/klst. skal stillipunktur línulegs lofthraða við úttak blásarans jafngilda tilsvarandi hraða keflis. Línulegur lofthraði við úttak blásarans skal haldast innan ±5 km/klst. eða ±10% af tilsvarandi hraða keflis, hvor talan sem er hærri.“

b) Eftirfarandi c-liður bætist við í lið 1.1.4:

„c) um það bil á miðlínu í langsniði ökutækisins.“

c) Í stað liða 1.1.5 og 1.1.6 kemur eftirfarandi:

„1.1.5. Að beiðni framleiðandans og ef viðurkenningaryfirvaldið telur það viðeigandi er heimilt að breyta hæð, hliðarlegu og fjarlægð kæliviftunnar frá ökutækinu.

Að beiðni framleiðandans og ef viðurkenningaryfirvaldið telur það viðeigandi er heimilt að breyta hæð, afköstum, lengdarstöðu og hliðarlegu kæliviftunnar og nota má viðbótarviftur sem geta haft mismunandi tilhögun (þ.m.t. viftur með stöðugan hraða) ef tilgreind útfærsla kæliviftunnar er óhentug fyrir tiltekin ökutæki eins og þau sem hafa aftanásettan hreyfil eða loftinntak á hliðunum eða ef kæliviftan veitir ekki hæfilega kælingu til að gefa rétta mynd af eðlilegri notkun.

1.1.6. Staðsetning og afköst kæliviftunnar eða kæliviftanna og ítarlegt innihald rökstuðningsins sem viðurkenningaryfirvaldinu er látið í té skulu koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum í tilvikunum sem lýst er í lið 1.1.5. Í öllum síðari prófunum skal nota svipaðar staðsetningar og tilhögun með hliðsjón af rökstuðningnum, til að forðast eiginleika við kælingu sem gefa ekki rétta mynd af eðlilegri notkun.“

d) Í stað liðar 2.1.2 kemur eftirfarandi:

„2.1.2. Nota má vegkefli með einu kefli eða tveimur keflum. Ef notað er vegkefli með tveimur keflum skulu keflin vera varanlega tengd en annars skal framkefli knýja, með beinum eða óbeinum hætti, allan tregðumassa og aflgleypandi búnað.“

e) Í stað liðar 2.2.7 kemur eftirfarandi:

„2.2.7. Hraði keflis skal mældur við tíðni sem er ekki minni en 10 Hz.“

f) Í stað liðanna 2.3, 2.3.1 og 2.3.1.1 kemur eftirfarandi:

„2.3. Sértækar viðbótarkröfur varðandi vegkefli í fjórhjóladrifsham

2.3.1. Stýrikerfi fjórhjóladrifs í vegkeflinu skal hannað þannig að eftirfarandi kröfur séu uppfylltar við prófun með ökutæki sem keyrt er í WLTC-prófunarlotu.

2.3.1.1. Líkja skal eftir ökumótstöðu þannig að notkun í fjórhjóladrifi á vegkeflinu framkalli sama hlutfall af afli og myndast við akstur ökutækis á sléttu, þurru og jöfnu yfirborði vegar.“

g) Í stað liðar 2.4.1 kemur eftirfarandi:

„2.4.1. Kraftmælikerfi

Nákvæmni kraftnemans skal vera a.m.k. ±10 N fyrir hverja mælda aukningu. Þetta skal sannprófað við upphaflega uppsetningu, eftir meiri háttar viðhald og innan 370 daga fyrir prófun.“

h) Í stað síðasta málsliðar í lið 3.3.2.2 kemur eftirfarandi:

„Sjá lið 2.1.3 í 6. undirviðauka.“

i) Í stað liðar 3.3.5.3 kemur eftirfarandi:

„3.3.5.3. Setja skal upp hitaskynjara beint framan við rúmmálsmælibúnaðinn. Þessi hitaskynjari skal hafa nákvæmni upp á ±1 °C og svörunartíma upp á 0,1 sekúndur við 62% af tilgreindum frávikum í hitastigi (gildi mælt í sílíkonolíu).“

j) Í stað liðar 3.3.6.1 kemur eftirfarandi:

„3.3.6.1. Ruðningsdæla

Heildarstreymisþynningarkerfi fyrir útblástur með ruðningsdælu uppfyllir kröfur þessa undirviðauka með mælingum á loftstreymi í gegnum dælu við stöðugt hitastig og stöðugan þrýsting. Heildarrúmmál er mælt með því að telja snúninga kvarðaðrar ruðningsdælu. Hlutfallslegu sýni er náð með því að taka sýni með dælu, streymismæli og stjórnloka við stöðugt streymi.“

k) Liður 3.3.6.1.1 fellur brott,

l) Í stað c-liðar í lið 3.3.6.4.3 kemur eftirfarandi:

„c) setja skal upp hitaskynjara (T) fyrir þynnt útblástursloft beint framan við úthljóðsstreymismælinn. Þessi skynjari skal hafa nákvæmni upp á ±1 °C og svörunartíma upp á 0,1 sekúndu við 62% af tilgreindum frávikum í hitastigi (gildi mælt í sílíkonolíu),“.

m) Í stað síðasta málsliðar í lið 3.4.1.1 kemur eftirfarandi:

„Búnaðurinn skal hafa vottaða nákvæmni.“

n) Lið 3.4.2.4 er breytt sem hér segir:

i. orðin „±0,2 K“ (þrjú tilvik) koma í stað orðanna „±0,2 °C“,

ii. orðin „±0,15 K“ (eitt tilvik) koma í stað orðanna „±0,15 °C“.

o) Lið 3.4.3.2 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrsta málsliðar kemur eftirfarandi:

„Mælingar fyrir kvörðun streymis í markstreymisþrengsli eru skyldubundnar og eftirfarandi gögn skulu vera innan þeirra nákvæmnismarka sem gefin eru:“.

ii. orðin „±0,2 K“ (eitt tilvik) koma í stað orðanna „±0,2 °C“.

iii. orðin „±0,15 K“ (eitt tilvik) koma í stað orðanna „±0,15 °C“.

p) Lið 3.4.5.6 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrsta málsliðar kemur eftirfarandi:

„Mælingar fyrir kvörðun streymis í úthljóðsstreymismæli eru skyldubundnar og eftirfarandi gögn (ef lagstreymisþáttur er notaður) skulu finnast innan þeirra nákvæmnismarka sem gefin eru:“

ii. orðin „±0,2 K“ (eitt tilvik) koma í stað orðanna „±0,2 °C“.

iii. orðin „±0,15 K“ (eitt tilvik) koma í stað orðanna „±0,15 °C“.

q) Í stað textans í síðustu málsgrein í lið 3.5.1.1

„2 prósent.“

kemur eftirfarandi:

"±2 prósent.“

r) Í lið 3.5.1.1.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Leiða skal þekktan massa af hreinum kolsýringi, koltvísýringi eða própangasi inn í gassýnissafnarakerfið gegnum kvarðað markstreymisop. Ef inntaksþrýstingurinn er nógu mikill þá er streymið q, sem er takmarkað með hjálp markstreymisopsins, óháð þrýstingi við úttaksopið (markstreymi). Gassýnissafnarakerfið skal látið ganga eins og tíðkast við venjulega útblástursprófun og gefa skal nægan tíma fyrir frekari greiningu. Greina skal gasið sem safnast í sýnatökusekknum með hefðbundnum búnaði (liður 4.1. í þessum undirviðauka) og niðurstöðurnar bornar saman við styrk þekktra gassýna. Ef frávik yfir 2% eiga sér stað skal ákvarða ástæðu bilunar og lagfæra hana.“

s) Liður 3.5.1.1.1.1 fellur brott.

t) Í lið 3.5.1.1.2 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Þyngd smáhólks sem er fylltur með annað hvort hreinum kolsýringi, koltvísýringi eða própani skal ákvörðuð svo ekki skeiki meira en ±0,01 g. Gassýnissafnarakerfið skal látið ganga eins og tíðkast við venjuleg skilyrði útblástursprófunar meðan hreinni lofttegund er dælt inn í kerfið í nógu langan tíma til að gera megi greiningu í kjölfarið. Beita skal mismunarvigtun til að ákvarða magn hreinnar lofttegundar. Greina skal gasið sem safnast í sekkinn með búnaði sem venjulega er notaður til greiningar á útblásturslofti eins og lýst er í lið 4.1. Niðurstöðurnar skulu því næst bornar saman við þær styrktölur sem áður voru reiknaðar út. Ef frávik yfir ±2% eiga sér stað skal ákvarða ástæðu bilunar og lagfæra hana.“

u) Liður 3.5.1.1.2.1 fellur brott.

v) Í lið 4.1.2.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Að undanskildum lið 4.1.3.1 (sýnatökukerfi fyrir vetniskolefni), lið 4.2 (búnaður til að mæla agnamassa) og lið 4.3 (búnaður til að mæla fjölda losaðra agna) má taka sýni af þynntu útblásturslofti neðan við meðhöndlunarbúnaðinn (ef einhver er).“

w) Liður 4.1.2.1.1 fellur brott.

x) Í lið 4.1.4.2 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Greiningartækið skal vera ódreifinn innroðagreinir (NDIR).“

y) Liður 4.1.4.2.1 fellur brott

z) Í lið 4.1.4.3 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Greiningartækið skal vera logajónunarnemi (FID) sem er kvarðaður með própangasi, tilgreint sem jafngildi kolefnisatóma (C 1).“

aa) Liður 4.1.4.3.1 fellur brott.

ab) Í lið 4.1.4.4 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Greiningartækið skal vera hitaður logajónunarnemi með nema, lokum, pípum, o.s.frv., hitaður að 190 °C ± 10 °C. Hann skal kvarðaður með própangasi, tilgreint sem jafngildi kolefnisatóma (C 1).“

ac) Liður 4.1.4.4.1 fellur brott.

ad) Í lið 4.1.4.5 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Greiningartækið skal annað hvort vera gasgreinir ásamt logajónunarnema (FID) eða logajónunarnemi ásamt metanskilju (NMC-FID), kvarðaður með metangasi eða própangasi sem tilgreint er sem jafngildi kolefnisatóma (C 1).“

ae) Liður 4.1.4.5.1 fellur brott.

af) Í lið 4.1.4.6 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Nota skal efnaljómunargreini (CLA) eða greiningartæki með ódreifnum útfjólubláum geisla (NDUV).“

ag) Liður 4.1.4.6.1 fellur brott.

ah) Í stað liðar 4.2.1.2.7 kemur eftirfarandi:

„4.2.1.2.7. Þau hitastig sem þörf er á fyrir mælingu á agnamassa skulu mæld með ±1 °C nákvæmni og 15 sekúndna eða styttri svörunartíma ($t_{90} - t_{10}$).“

ai) Í lið 4.2.1.3.2 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Allar sveigjur í færslulögninni fyrir agnir skulu vera sléttar og hafa stærsta mögulegan radíus.“

aj) Liður 4.2.1.3.2.1 fellur brott.

ak) Í stað liðar 4.2.2.2 kemur eftirfarandi:

„4.2.2.2. Línuleg svörun fínvogar

Fínvog, sem er notuð til að ákvarða þyngd síunnar, skal uppfylla viðmiðunina um sannprófun á línuleika í töflu A5/1 með línulegu aðhvarfi. Þetta felur í sér a.m.k. ±2 µg nákvæmni og a.m.k. 1 µg upplausn (1 tölustafur = 1 µg). Prófa skal a.m.k. fjórar viðmiðunarþyngdir sem eru á jöfnu millibili. Núllgildi skal vera innan ±1 µg.

Tafla A5/1

Viðmiðanir um sannprófun fínvogar

Mælikerfi	Skurðpunktur a0	Halli a1	Staðalskekkja á mati (SEE)	Ákvörðunarstuðull r^2
Agnamassavog	≤ 1 µg	0,99 – 1,01	að hámarki ≤ 1%	≥ 0,998“.

al) Í stað liða 5.3.1.1 og 5.3.1.2 kemur eftirfarandi:

„5.3.1.1. Kvörðunin skal athuguð með núllstillingarlofttegund og með kvörðunargasi í samræmi við lið 2.14.2.3 í 6. undirviðauka.

5.3.1.2. Eftir prófun skal nota núllstillingarlofttegund og sama kvörðunargasið til endurathugunar í samræmi við lið 2.14.2.4 í 6. undirviðauka.“

am) Í lið 5.5.1.7 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Skilvirkni breytisins skal ekki vera undir 95%. Prófa skal skilvirkni breytisins með því millibili sem tilgreint er í töflu A5/3.“

an) Liður 5.5.1.7.1 fellur brott.

ao) í lið 5.6 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Kvörðun míkrógrammavogar, sem notuð er við vigtun á sýnatökusíum fyrir agnir, skal vera rekjanleg til landsbundins eða alþjóðlegs staðals. Vogin skal uppfylla kröfur um línuleika sem gefnar eru upp í lið 4.2.2.2. Sannprófun á línuleika skal gerð a.m.k. á 12 mánaða fresti eða í hvert sinn sem farið hefur fram viðgerð eða breyting á kerfinu sem gæti haft áhrif á kvörðunina.“

ap) Liður 5.6.1. fellur brott.

aq) Í lið 5.7.3 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Í mánaðarlegri athugun með kvörðuðum streymismæli skal streymið inn í agnateljarann skila mæligildi sem er innan við 5% af nafnstreymi gegnum agnateljarann.“

ar) Liður 5.7.3.1 fellur brott.

as) Í stað liðar 6.1.1 kemur eftirfarandi:

„6.1.1. Skilja ber öll gildi sem eru gefin upp sem milljónarhlutar (ppm) sem milljónarhluta miðað við rúmmál (vpm)“.

at) Í stað liða 6.1.2.1 og 6.1.2.2 kemur eftirfarandi:

„6.1.2.1. Köfnunarefni:

Hreinleiki: ≤ 1 ppm C_1, ≤ 1 ppm CO, ≤ 400 ppm CO_2, ≤ 0,1 ppm NO, ≤ 0,1 ppm N_2O, ≤ 0,1 ppm NH_3.

6.1.2.2. Tilbúið loft:

Hreinleiki: ≤ 1 ppm C_1, ≤ 1 ppm CO, ≤ 400 ppm CO_2, ≤ 0,1 ppm NO, ≤ 0,1 ppm NO_2; súrefnisinnihald á milli 18 og 21% miðað við rúmmál.“

au) Í stað liðar 6.2 kemur eftirfarandi:

„6.2. Kvörðunargas

Raunstyrkur kvörðunargass skal ekki víkja frá tilgreindum gildum um meira en ±1% eða eins og tilgreint er hér á eftir og skal vera rekjanlegur til landsbundinna eða alþjóðlegra staðla.

Gasblöndur með eftirfarandi samsetningar skulu aðgengilegar með forskriftum um lofttegundir í lausu í samræmi við liði 6.1.2.1 eða 6.1.2.2:

a) C_3H_8 blandað við tilbúið loft (sjá lið 6.1.2.2),

b) CO blandað við köfnunarefni,

c) CO_2 blandað við köfnunarefni,

d) CH_4 blandað við tilbúið loft,

e) NO blandað við köfnunarefni (magn NO_2 í þessu kvörðunargasi skal ekki vera meira en 5% af NO-innihaldi).“

av) Liður 6.2.1. fellur brott.

31) Í stað 6. undirviðauka kemur eftirfarandi:

„6. undirviðauki

Aðferðir og skilyrði fyrir prófun 1

1. Lýsing á prófunum

1.1. Prófun 1 er notuð til að sannprófa losun loftkenndra efnasambanda, agnamassa, fjölda agna, massa koltvísýringslosunar, eldsneytisnotkun, raforkunotkun og rafdrægni í viðeigandi WLTP-prófunarlotu.

1.1.1. Prófanirnar skulu framkvæmdar í samræmi við þá aðferð sem lýst er í 2. lið í þessum undirviðauka eða 3. lið í 8. undirviðauka fyrir hrein rafökutæki, tvinnrafökutæki og tvinnökutæki með efnarafala með þjöppuðu vetni (e. *compressed hydrogen fuel cell hybrid vehicle*). Taka skal sýni af útblásturslofti, agnamassa og agnafjölda og greina samkvæmt þeim aðferðum sem mælt er fyrir um.

1.2. Fjöldi prófana skal ákvarðaður í samræmi við flæðiritið á mynd A6/1. Viðmiðunarmörkin eru hæsta leyfilega gildið fyrir viðkomandi markgildalosun eins og tilgreint er í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.

1.2.1. Flæðiritið á mynd A6/1 skal einungis gilda um viðeigandi WLTP-prófunarlotu í heild sinni en ekki um staka fasa hennar.

1.2.2. Prófunarniðurstöðurnar eru þau gildi sem fást eftir leiðréttingu á markhraða, leiðréttingu á grundvelli orkubreytingar endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins, Ki-leiðréttingu, ATCT-leiðréttingu og leiðréttingu á spillistuðli.

1.2.3. Ákvörðun á gildum fyrir heildarlotu

1.2.3.1. Ökutækinu skal hafnað ef farið er yfir mörk fyrir markgildalosun meðan á nokkurri prófun stendur.

1.2.3.2. Með hliðsjón af gerð ökutækis skal framleiðandi tilgreina, eftir því sem við á, gildandi gildi fyrir heila lotu fyrir massa koltvísýringslosunar, raforkunotkun, eldsneytisnotkun fyrir tvinnökutæki með efnarafala, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu (NOVC-FCHV) sem og fyrir hreina rafdrægni (PER) og fulla rafdrægni (AER) samkvæmt töflu A6/1.

1.2.3.3. Yfirlýst gildi fyrir raforkunotkun fyrir tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu við rekstrarskilyrði í afhleðsluham skal ekki ákvarðað í samræmi við mynd A6/1. Það skal tekið sem gerðarviðurkenningargildi ef yfirlýst koltvísýringsgildi er samþykkt sem viðurkenningargildið. Ef sú er ekki raunin skal mæligildi raforkunotkunar tekið sem gerðarviðurkenningargildið.

1.2.3.4. Ef allar viðmiðanir í línu 1 í viðeigandi töflu A6/2 eru uppfylltar eftir fyrstu prófun skulu öll gildi sem framleiðandi tilgreinir samþykkt sem gerðarviðurkenningargildi. Ef einhverjar viðmiðanir í línu 1 í viðeigandi töflu A6/2 eru ekki uppfylltar skal framkvæma aðra prófun með sama ökutæki.

1.2.3.5. Eftir þessa seinni prófun skal reikna út meðalgildi niðurstaðna úr prófununum tveimur. Ef allar viðmiðanir í línu 2 í viðeigandi töflu A6/2 uppfylla þessi meðalgildi niðurstaðna skulu öll gildin sem framleiðandi tilgreinir samþykkt sem gerðarviðurkenningargildi. Ef einhverjar viðmiðanir í línu 2 í viðeigandi töflu A6/2 eru ekki uppfylltar skal framkvæma þriðju prófun með sama ökutæki.

1.2.3.6. Eftir þessa þriðju prófun skal reikna út meðalgildi niðurstaðna úr prófununum þremur. Fyrir alla mæliþætti sem uppfylla samsvarandi viðmiðun í línu 3 í viðeigandi töflu A6/2 skal uppgefið gildi tekið sem gerðarviðurkenningargildi. Fyrir hvern mæliþátt sem uppfyllir ekki samsvarandi viðmiðun í línu 3 í viðeigandi töflu A6/2 skal meðalgildi niðurstaðna tekið sem gerðarviðurkenningargildi.

1.2.3.7. Ef einhver viðmiðun í viðeigandi töflu A6/2 er ekki uppfyllt eftir fyrstu eða seinni prófunina er heimilt, að beiðni framleiðanda og með samþykkt viðurkenningaryfirvalds, að tilgreina gildin aftur sem hærri gildi fyrir losun eða notkun eða sem lægri gildi fyrir rafdrægni til þess að draga úr þeim fjölda prófana sem þörf er á fyrir gerðarviðurkenningu.

1.2.3.8. Ákvörðun viðurkenningargildis $dCO2_1$, $dCO2_2$ og $dCO2_3$

1.2.3.8.1. Til viðbótar við kröfuna í lið 1.2.3.8.2 skal nota eftirfarandi gildi fyrir $dCO2_1$, $dCO2_2$ og $dCO2_3$ í tengslum við viðmiðanirnar fyrir fjölda prófana í töflu A6/2:

$dCO2_1 = 0{,}990$

$dCO2_2 = 0{,}995$

$dCO2_3 = 1{,}000$

1.2.3.8.2. Ef afhleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu, samanstendur af tveimur eða fleiri viðeigandi WLTP-prófunarlotum og dCO2x-gildið er undir 1,0 skal skipta út dCO2x-gildinu fyrir 1,0.

1.2.3.9. Ef prófunarniðurstaða eða meðaltal prófunarniðurstaðna er staðfest og tekið sem gerðarviðurkenningargildi skal vísað til þeirrar niðurstöðu sem „uppgefið gildi“ í tengslum við frekari útreikninga.

Tafla A6/1

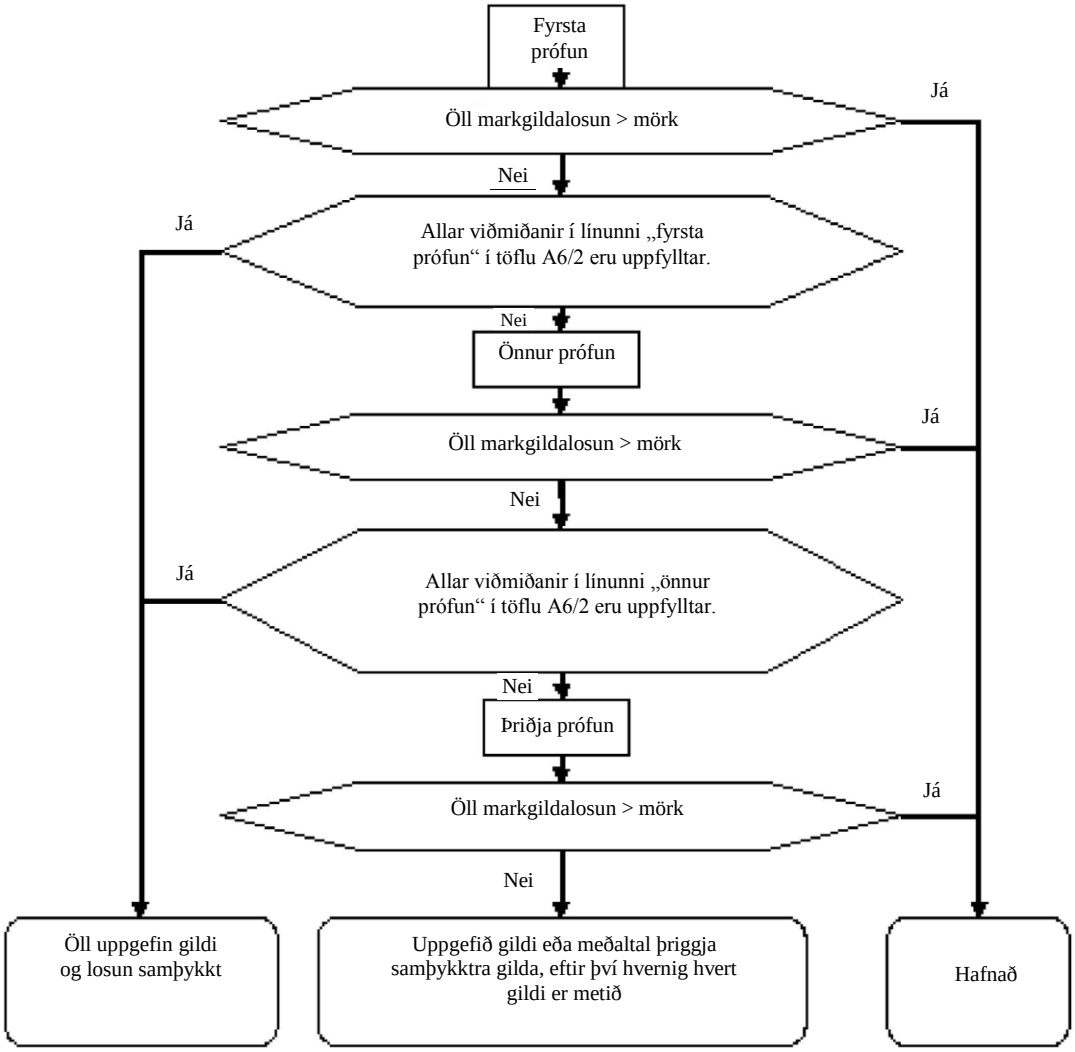
Viðeigandi reglur fyrir uppgefin gildi framleiðanda (gildi fyrir heildarlotu) (1)

Gerð ökutækis		M_{CO2} (2) (g/km)	FC (kg/100 km)	Raforkunotkun (3) (Wh/km)	Full rafdrægni (AER)/hrein rafdrægni (3) (km)
Ökutæki prófuð í samræmi við 6. undirviðauka (hrein brunahreyfilsökutæki)		M_{CO2} 3. liður í 7. undirviðauka.	—	—	—
NOVC-FCHV		—	FC_{CS} Liður 4.2.1.2.1 í 8. undirviðauka.	—	—
NOVC-HEV		$M_{CO2,CS}$ Liður 4.1.1 í 8. undirviðauka.	—	—	—
OVC-HEV	CD	$M_{CO2,CD}$ Liður 4.1.2 í.	—	$EC_{AC,CD}$ Liður 4.3.1 í 8. undirviðauka.	AER Liður 4.4.1.1 í 8. undirviðauka.
	CS	$M_{CO2,CS}$ 8. undirviðauki Liður 4.1.1 í 8. undirviðauka.	—	—	—
PEV		—	—	EC_{WLTC} Liður 4.3.4.2 í 8. undirviðauka.	PER_{WLTC} Liður 4.4.2 í 8. undirviðauka.

(1) Uppgefið gildi skal vera það gildi sem nauðsynlegar leiðréttingar eru gerðar á (t.d. Ki-leiðrétting, ATCT-leiðrétting og leiðrétting á spillistuðli)
(2) Námundun xxx,xx
(3) Námundun xxx,x

Mynd A6/1

Flæðirit fyrir fjölda prófana 1



Tafla A6/2

Viðmiðanir fyrir fjölda prófana

Hleðsluprófun 1 fyrir hrein brunahreyfilsökutæki, tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu.

	Prófun	Mæliþáttur mats	Markgildalosun	M_{CO2}
Lína 1	Fyrsta prófun	Niðurstöður úr fyrstu prófun	≤ Viðmiðunarmörk × 0,9	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_1$
Lína 2	Önnur prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr fyrstu og annarri prófun	≤ Viðmiðunarmörk × 1,0 (1)	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_2$
Lína 3	Þriðja prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr þremur prófunum	≤ Viðmiðunarmörk × 1,0 (1)	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_3$

(1) Sérhver prófunarniðurstaða skal uppfylla viðmiðunarmörkin.

Afhleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu.

	Prófun	Mæliþáttur mats	Markgildalosun	$M_{CO2,CD}$	AER
Lína 1	Fyrsta prófun	Niðurstöður úr fyrstu prófun	≤ Viðmiðunar-mörk × 0,9 (1)	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_1$	≥ Uppgefið gildi × 1,0
Lína 2	Önnur prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr fyrstu og annarri prófun	≤ Viðmiðunar-mörk × 1,0 (2)	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_2$	≥ Uppgefið gildi × 1,0
Lína 3	Þriðja prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr þremur prófunum	≤ Viðmiðunar-mörk × 1,0 (2)	≤ Uppgefið gildi × $dCO2_3$	≥ Uppgefið gildi × 1,0

(1) Aðeins skal skipta út „0,9“ fyrir „1,0“ í tengslum við afhleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu, ef afhleðsluprófunin felur í sér tvær eða fleiri gildandi WLTC-lotur.
(2) Sérhver prófunarniðurstaða skal uppfylla viðmiðunarmörkin.

Fyrir hrein rafökutæki

	Prófun	Mæliþáttur mats	Raforkunotkun	Hrein rafdrægni (PER)
Lína 1	Fyrsta prófun	Niðurstöður úr fyrstu prófun	≤ Yfirlýst gildi × 1,0	≥ Uppgefið gildi × 1,0
Lína 2	Önnur prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr fyrstu og annarri prófun	≤ Yfirlýst gildi × 1,0	≥ Uppgefið gildi × 1,0
Lína 3	Þriðja prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr þremur prófunum	≤ Yfirlýst gildi × 1,0	≥ Yfirlýst gildi × 1,0

Fyrir tvinnökutæki sem eru ekki ætluð fyrir ytri hleðslu

	Prófun	Mæliþáttur mats	FC_{CS}
Lína 1	Fyrsta prófun	Niðurstöður úr fyrstu prófun	≤ Yfirlýst gildi × 1,0
Lína 2	Önnur prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr fyrstu og annarri prófun	≤ Yfirlýst gildi × 1,0
Lína 3	Þriðja prófun	Meðalgildi af niðurstöðum úr þremur prófunum	≤ Yfirlýst gildi × 1,0

1.2.4. Ákvörðun fasatengdra gilda

1.2.4.1. Fasatengt koltvísýringsgildi

1.2.4.1.1. Eftir að uppgefið gildi fyrir massa koltvísýringslosunar fyrir heildarlotuna er samþykkt, skal meðalgildið fyrir fasatengd gildi úr prófunarniðurstöðum í g/km margfaldað með leiðréttingarstuðlinum CO2_AF til að jafna mismuninn milli uppgefins gildis og niðurstaðna úr prófunum. Þetta leiðrétta gildi er gerðarviður-kenningargildið fyrir CO_2.

$$\text{CO2\_AF} = \frac{\text{Tilgreint gildi}}{\text{Samanlagt gildi í fasa}}$$

þar sem:

$$\text{Samanlagt gildi í fasa} = \frac{\left(CO2_{ave_L} \times D_L\right) + \left(CO2_{ave_M} \times D_M\right) + \left(CO2_{ave_H} \times D_H\right) + \left(CO2_{ave_{exH}} \times D_{exH}\right)}{D_L + D_M + D_H + D_{exH}}$$

þar sem:

$CO2_{ave_L}$ er meðalgildi niðurstaðna fyrir massalosun koltvísýrings úr prófun(um) í L-fasa, í g/km,

$CO2_{ave_M}$ er meðalgildi niðurstaðna fyrir massalosun koltvísýrings úr prófun(um) í M-fasa, í g/km,

$CO2_{ave_H}$ er meðalgildi niðurstaðna fyrir massalosun koltvísýrings úr prófun(um) í H-fasa, í g/km,

$CO2_{ave_{exH}}$ er meðalgildi niðurstaðna fyrir massalosun koltvísýrings úr prófun(um) í exH-fasa, í g/km,

D_L er fræðileg vegalengd í L-fasa, í km,

D_M er fræðileg vegalengd í M-fasa, í km,

D_H er fræðileg vegalengd í H-fasa, í km,

D_{exH} er fræðileg vegalengd í exH-fasa, í km.

1.2.4.1.2. Ef uppgefið gildi fyrir massalosun koltvísýrings í heildarlotu er ekki samþykkt skal reikna út gerðarviðurkenningargildið fyrir fasatengda massalosun koltvísýrings með því að taka meðalgildi af öllum prófunarniðurstöðum fyrir viðeigandi fasa.

1.2.4.2. Fasatengd gildi fyrir eldsneytisnotkun

Reikna skal út gildi eldsneytisnotkunar út frá fasatengdri massalosun koltvísýrings með jöfnunum í lið 1.2.4.1 í þessum undirviðauka og meðalgildi losunarinnar.

1.2.4.3. Fasatengt gildi raforkunotkunar (hrein rafdrægni (PER) og full rafdrægni (AER))

Reikna skal út fasatengda raforkunotkun og fasatengda rafdrægni með því að nota meðalgildi fasatengdra gilda úr prófunarniðurstöðunum, án leiðréttingarstuðuls.

2. Prófunarskilyrði fyrir prófun 1

2.1. Yfirlit

2.1.1. Prófun 1 skal samanstanda af tilgreindum röðum við undirbúning aflmælis og skilyrðum er varða eldsneytisáfyllingu, varmajafnvægi og rekstrarskilyrði.

2.1.2. Prófun 1 felur í sér að ökutækinu er ekið á vegkefli í WLTC-prófunarlotu sem gildir fyrir brúunarhópinn. Safna skal samfellt hlutfallslegu sýni af þynntu útblásturslofti fyrir greiningu sem gerð er í kjölfarið og til þess er notast við gassýnissafnara.

2.1.3. Mæla skal bakgrunnsstyrk fyrir öll efnasambönd sem mælingar á massa þynntrar losunar eru gerðar fyrir. Við prófun á losun með útblæstri krefst þetta sýnatöku og greiningar á þynningarloftinu.

2.1.3.1. Mæling á bakgrunnsgildi agnamassa

2.1.3.1.1. Ef framleiðandi óskar eftir því að bakgrunnsgildi agnamassa í annaðhvort þynningarlofti eða í þynningarröri verði dregin frá losunarmælingum, skal ákvarða þessi bakgrunnsgildi í samræmi við þær aðferðir sem eru tilgreindar í liðum 2.1.3.1.1.1 til 2.1.3.1.1.3 í þessum undirviðauka.

2.1.3.1.1.1. Mesta leyfilega leiðréttingin á bakgrunnsgildi skal vera massi á síunni sem jafngildir 1 mg/km við streymið í prófuninni.

2.1.3.1.1.2. Ef bakgrunnsstyrkurinn er hærri en þetta gildi skal sjálfgildið 1 mg/km dregið frá.

2.1.3.1.1.3. Ef frádráttur bakgrunnsstyrks gefur neikvæða niðurstöðu skal bakgrunnsgildið teljast núll.

2.1.3.1.2. Bakgrunnsgildi agnamassa í þynningarlofti skal ákvarðað með því að leiða síað þynningarloft í gegnum bakgrunnssíuna fyrir agnamassa. Loftið skal tekið á punkti sem er beint neðan við síur fyrir þynningarloft. Bakgrunnsgildi í $\mu g/m^3$ skulu ákvörðuð sem hlaupandi meðalgildi úr a.m.k. 14 mælingum með a.m.k. einni mælingu í viku.

2.1.3.1.3. Bakgrunnsgildi agnamassa í þynningarröri skal ákvarðað með því að leiða síað þynningarloft í gegnum bakgrunnssíuna fyrir agnamassa. Loftið skal tekið á sama punkti og agnasýni er tekið. Ef síðari þynning er notuð í prófuninni skal síðara þynningarkerfið vera virkt fyrir bakgrunnsmælingu. Gera má eina mælingu á prófunardegi, annaðhvort fyrir eða eftir prófun.

2.1.3.2. Ákvörðun á fjölda bakgrunnsagna

2.1.3.2.1. Ef framleiðandi óskar eftir leiðréttingu á bakgrunnsgildi skulu þessi bakgrunnsgildi ákvörðuð með eftirfarandi hætti:

2.1.3.2.1.1. Bakgrunnsgildið má annaðhvort reikna út eða mæla. Mesta leyfilega leiðrétting á bakgrunnsgildi skal vera í tengslum við mesta leyfilega leka í mælikerfinu fyrir fjölda agna (0,5 agnir á hvern cm^3), kvarðað út frá skerðingarstuðlinum fyrir styrk efnisagna (PCRF) og því streymi í gassýnissafnaranum sem notað er í prófuninni sjálfri,

2.1.3.2.1.2. annaðhvort viðurkenningaryfirvaldið eða framleiðandinn má krefjast þess að notaðar séu raunverulegar bakgrunnsmælingar í staðinn fyrir útreiknaðar bakgrunnsmælingar.

2.1.3.2.1.3. Ef frádráttur bakgrunnsstyrks gefur neikvæða niðurstöðu skal fjöldi agna teljast núll.

2.1.3.2.2. Bakgrunnsgildi agnafjölda í þynningarloftinu skal ákvarðað með sýnatöku úr síuðu þynningarlofti. Loftið skal tekið á punkti sem er beint neðan við síur fyrir þynningarloft inn í mælikerfið fyrir fjölda agna. Bakgrunnsgildin í ögnum á hvern cm^3 skulu ákvörðuð sem hlaupandi meðalgildi úr a.m.k. 14 mælingum með a.m.k. einni mælingu í viku.

2.1.3.2.3. Bakgrunnsgildi agna í þynningarrörinu skal ákvarðað með sýnatöku úr síuðu þynningarlofti. Loftið skal tekið á sama punkti og sýnið til að mæla agnafjölda. Ef síðari þynning er notuð í prófuninni skal síðara þynningarkerfið vera virkt þegar bakgrunnsmælingin er gerð. Framkvæma má eina mælingu á prófunardegi, annaðhvort fyrir eða eftir prófun, með því að nota raunverulega skerðingarstuðulinn fyrir styrk efnisagna og það streymi í gassýnissafnara sem notað er í prófuninni.

2.2. Almennur búnaður í prófunarklefa

2.2.1. Mæliþættir sem skulu mældir

2.2.1.1. Mæla skal eftirfarandi hitastig með nákvæmni sem nemur ±1,5 °C:

a) Andrúmsloft í prófunarklefa,

b) hitastig í þynningarkerfi og sýnatökukerfi samkvæmt því sem krafist er fyrir þau mælikerfi fyrir losun sem tilgreind eru í 5. undirviðauka.

2.2.1.2. Loftþrýstingur skal vera mælanlegur með nákvæmni sem nemur ±0,1 kPa.

2.2.1.3. Sértækur raki (H) skal mælanlegur með nákvæmni sem nemur ±1 g H_2O/kg af þurru lofti.

2.2.2. Prófunarklefi og varmajafnvægissvæði

2.2.2.1. Prófunarklefi

2.2.2.1.1. Stillipunktur hitastigs í prófunarklefanum skal vera 23 °C. Vikmörk raungildis skulu vera innan við ±5 °C. Mæla skal lofthita og raka við úttak kæliviftu í prófunarklefanum með 0,1 Hz lágmarkstíðni. Upplýsingar um hitastigið við upphaf prófunar eru í lið 2.8.1 í þessum undirviðauka.

2.2.2.1.2. Sértækur raki (H) í annaðhvort loftinu í prófunarklefanum eða inntaksloftinu í hreyflinum skal uppfylla eftirfarandi skilyrði:

$$5{,}5 \leq H \leq 12{,}2 \text{ (g } H_2O\text{/kg af þurru lofti)}$$

2.2.2.1.3. Raki skal stöðugt mældur með 0,1 Hz lágmarkstíðni.

2.2.2.2. Varmajafnvægissvæði

Stillipunktur hitastigs á jöfnunarsvæðinu skal vera 23 °C og vikmörk raungildis skulu vera innan ±3 °C fyrir fimm mínútna hlaupandi meðalgildi og skulu ekki sýna kerfisbundið frávik frá stillipunktinum. Hitastig skal stöðugt mælt á 0,033 Hz lágmarkstíðni (á 30 sekúndna fresti).

2.3. Prófunarökutæki

2.3.1. Almenn atriði

Allir íhlutir hvers prófunarökutækis skulu vera í samræmi við framleiðsluröðina eða ef ökutæki er frábrugðið framleiðsluröðinni skal öllum viðeigandi prófunarskýrslum fylgja ítarleg lýsing þar að lútandi. Þegar prófunarökutækið er valið skulu framleiðandinn og viðurkenningaryfirvaldið vera sammála um hvaða gerð ökutækis er dæmigerð fyrir brúunarhópinn.

Við mælingu á losun skal beita þeirri ökumótstöðu sem er ákvörðuð með prófunarökutæki H. Ef um er að ræða ökumótstöðufylkjahóp skal beita þeirri ökumótstöðu sem reiknuð er út fyrir ökutæki H_M í samræmi við lið 5.1 í 4. undirviðauka við mælingu á losun.

Ef brúunaraðferðin er notuð að beiðni framleiðanda (sjá lið 3.2.3.2 í 7. undirviðauka) skal framkvæma viðbótarmælingu á losun með þeirri ökumótstöðu sem er ákvörðuð með prófunarökutæki L. Framkvæma ætti prófanir á ökutækjum H og L með sama prófunarökutæki og prófa skal með stysta hlutfalli snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis innan brúunarhópsins (með ±1,5% vikmörkum). Ef um er að ræða ökumótstöðufylkjahóp skal framkvæma viðbótarmælingu á losun með þeirri ökumótstöðu sem reiknuð er út fyrir ökutæki L_M í samræmi við lið 5.1 í 4. undirviðauka.

Taka má ökumótstöðustuðlar og prófunarmassa prófunarökutækja L og H úr mismunandi ökumótstöðuhópum svo fremi sem munurinn á milli þessara ökumótstöðuhópa stafar af beitingu liðar 6.8 í 4. undirviðauka og að kröfunum í lið 2.3.2 í þessum undirviðauka er viðhaldið.

2.3.2. Brúunarsvið koltvísýrings

2.3.2.1. Einungis skal nota brúunaraðferðina ef:

a) Munurinn á koltvísýringslosun í gegnum viðeigandi prófunarlotu, sem stafar af þrepi nr. 9 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka, á milli prófunarökutækja L og H er á milli 5 g/km lágmarks og hámarks sem skilgreint er í lið 2.3.2.2,

b) koltvísýringsgildi sem stafa af þrepi nr. 9 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka eru hærri fyrir ökutæki H en þau eru fyrir ökutæki L varðandi öll viðeigandi fasagildi.

Ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar er hægt að lýsa prófanirnar ógildar og endurtaka þær í samráði við viðurkenningaryfirvaldið.

2.3.2.2. Leyfilegt hámarks Delta fyrir koltvísýringslosun í viðeigandi prófunarlotu, sem stafar af þrepi nr. 9 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka, á milli prófunarökutækja L og H er 20% auk 5 g/km af koltvísýringslosun frá ökutæki H en a.m.k. 15 g/km og að hámarki 30 g/km.

Þessi takmörkun gildir ekki við notkun ökumótstöðufylkjahóps.

2.3.2.3. Að beiðni framleiðanda og með samþykkt viðurkenningaryfirvalds má framreikna línulega brúun að hámarki sem er 3 g/km meira en koltvísýringslosun ökutækis H og/eða minna en koltvísýringslosun ökutækis L. Þessi framreikningur gildir einungis innan þeirra nákvæmu marka brúunarsviðs sem tilgreind eru í lið 2.3.2.2.

Framreikningur er ekki leyfilegur við notkun ökumótstöðufylkjahóps

Öll einstök ökutæki með eins forskriftir (t.d. tegund, undirtegund, valfrjáls búnaður) skulu tilheyra einungis einum af brúunarhópunum ef tveir eða fleiri brúunarhópar eru eins að því er varðar kröfurnar í lið 5.6 í þessum viðauka en eru mismunandi vegna þess að heildarsvið koltvísýrings væri hærra en hámarks Delta sem tilgreint er í lið 2.3.2.2.

2.3.3. Tilkeyrsla

Ökutækið skal afhent í góðu tæknilegu ásigkomulagi. Það skal vera tilkeyrt og því hafa verið ekið milli 3000 og 15 000 km áður en prófunin fer fram. Tilkeyra skal hreyfillinn, gírskiptinguna og ökutækið í samræmi við leiðbeiningar framleiðandans.

2.4. Stillingar

2.4.1. Framkvæma skal aflmælisstillingar og sannprófun í samræmi við 4. undirviðauka.

2.4.2. Starfræksla aflmælis

2.4.2.1. Slökkva skal á aukabúnaði eða gera hann óvirkan meðan á notkun aflmælis stendur nema að notkun hans sé krafist samkvæmt löggjöf.

2.4.2.2. Ef aflmælir ökutækis hefur notkunarham skal kveikja á honum samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (t.d. beita hnöppum á stýrishjóli ökutækis í sérstakri runu, nota prófunarbúnað á verkstæði framleiðanda, fjarlægja öryggi).

Framleiðandi skal láta viðurkenningaryfirvaldi í té skrá yfir búnað sem hefur verið gerður óvirkur, ásamt rökstuðningi fyrir hvers vegna hann var gerður óvirkur. Viðurkenningaryfirvaldið skal viðurkenna notkunarham aflmælis og notkun hamsins skal tilgreind í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

2.4.2.3. Með notkunarham aflmælis í ökutækinu skal ekki setja í gang, stilla, tefja eða enda notkun nokkurs annars hluta sem hefur áhrif á losun og eldsneytisnotkun við prófunarskilyrði. Til að tryggja eðlilega virkni skal stilla hvers konar búnað sem hefur áhrif á notkun vegkeflis.

2.4.2.4. Úthlutun á gerðum vegkefla fyrir prófunarökutæki

2.4.2.4.1. Ef prófunarökutæki hefur tvo aflása og við WLTP-skilyrði er að hluta til eða að öllu leyti notað með tvo ása sem skila knúningsorku eða endurheimta orku meðan á viðeigandi prófunarlotu stendur skal það ökutæki prófað á vegkefli í fjórhjóladrifsham sem uppfyllir nákvæmar skilgreiningar í liðum 2.2 og 2.3 í 5. undirviðauka.

2.4.2.4.2. Ef prófunarökutæki er prófað með einungis einum aflás skal það prófað á vegkefli í tvíhjóladrifsham sem uppfyllir nákvæmar skilgreiningar í lið 2.2. í 5. undirviðauka.

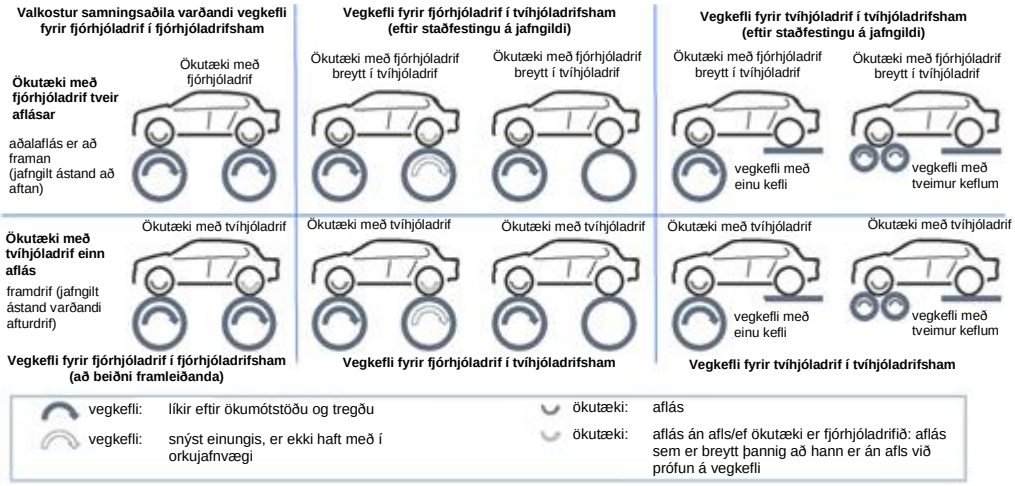
Með samþykki viðurkenningaryfirvalds og ef framleiðandi óskar eftir því er heimilt að ökutæki með einn aflás sé prófað á vegkefli fyrir fjórhjóladrif í fjórhjóladrifsham.

2.4.2.4.3. Ef prófunarökutækið er notað með tvo aflknúna ása í sérstökum valkvæðum notkunarhömum sem eru ekki ætlaðir fyrir venjulega daglega notkun heldur einungis ætlaðir fyrir sérstakan takmarkaðan tilgang, t.d. „fjallahamur“ eða „viðhaldshamur“, eða ef hamurinn með tvo aflása er einungis virkjaður í aðstæðum utan vega skal ökutækið prófað á vegkefli í tvíhjóladrifsham sem uppfyllir nákvæmu skilgreiningarnar í lið 2.2 í 5. undirviðauka.

2.4.2.4.4. Ef prófunarökutæki er prófað á vegkefli fyrir fjórhjóladrif í tvíhjóladrifsham geta hjólin á ásnum sem er án afls snúist við prófunina, að því tilskildu að notkunarhamur aflmælis í ökutækinu og fríhjólunarhamur ökutækis styðji þessa aðgerð.

Mynd A6/1a

Mögulegar útfærslur prófunar á vegkeflum fyrir tvíhjóladrif og vegkeflum fyrir fjórhjóladrif



2.4.2.5. Staðfesting á jafngildi milli aflmælis í tvíhjóladrifsham og aflmælis í fjórhjóladrifsham

2.4.2.5.1. Með samþykki viðurkenningaryfirvalds og ef framleiðandi óskar eftir því er heimilt að ökutæki sem prófa verður á vegkefli í fjórhjóladrifsham sé að öðrum kosti prófað á vegkefli í tvíhjóladrifsham ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

a. Prófunarökutæki er breytt þannig að það hefur einungis einn aflás,

b. framleiðandi sýnir viðurkenningaryfirvaldinu fram á að koltvísýringur, eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun í breyttu ökutæki sé eins og eða meiri en hjá óbreyttu ökutæki sem prófað er með vegkefli í fjórhjóladrifsham,

c. rekstraröryggi er tryggt við prófunina (t.d. með því að fjarlægja öryggi eða taka niður drifskaft) og leiðbeiningar eru látnar í té ásamt notkunarham aflmælis,

d. breytingin er einungis gerð á ökutæki sem prófað er á vegkefli og ákvörðunaraðferðin fyrir ökumótstöðu skal gerð á óbreyttu prófunarökutæki.

2.4.2.5.2. Þessi staðfesting á jafngildi gildir um öll ökutæki í sama ökumótstöðuhópnum. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins er hægt að rýmka gildissvið þessarar staðfestingar á jafngildi til að hún nái yfir aðra ökumótstöðuhópa eftir staðfestingu á því að ökutæki úr lakasta ökumótstöðuhópnum hafi verið valið sem prófunarökutækið.

2.4.2.6. Í öllum viðeigandi prófunarskýrslum skulu vera upplýsingar um það hvort ökutækið var prófað á vegkefli fyrir tvíhjóladrif eða á vegkefli fyrir fjórhjóladrif og hvort það var prófað á vegkefli í tvíhjóladrifsham eða í fjórhjóladrifsham. Ef ökutæki var prófað á vegkefli fyrir fjórhjóladrif og vegkeflið var í tvíhjóladrifsham skulu þessar upplýsingar einnig gefa til kynna hvort hjólin á ásnum sem er án afls hafi snúist eða ekki.

2.4.3. Útblásturskerfi ökutækisins skal ekki sýna neinn leka sem líklegur er til að draga úr magni safnaðra lofttegunda.

2.4.4. Stillingar aflrásar og stjórntækja ökutækisins skulu vera þær sem framleiðandi mælir fyrir um fyrir raðframleiðslu.

2.4.5. Hjólbarðarnir skulu vera af gerð sem framleiðandi ökutækis tilgreinir að sé upprunalegur búnaður. Auka má þrýsting í hjólbörðum um allt að 50% yfir þeim þrýstingi sem er tilgreindur í lið 4.2.2.3 í 4. undirviðauka. Nota skal sama þrýsting í hjólbörðum við stillingu aflmælis og í öllum síðari prófunum. Þrýstingur í hjólbörðum sem er notaður skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

2.4.6. Viðmiðunareldsneyti

Við prófunina skal nota viðeigandi viðmiðunareldsneyti sem er tilgreint í IX. viðauka.

2.4.7. Undirbúningur prófunarökutækis

2.4.7.1. Ökutækið skal vera u.þ.b. lárétt meðan prófunin fer fram til að koma í veg fyrir óeðlilega tilfærslu eldsneytisins.

2.4.7.2. Ef nauðsyn krefur skal framleiðandi leggja fram viðbótartengingar og millistykki, eins og þarf til að eldsneytistæming sé möguleg á neðsta hugsanlega punkti eldsneytisgeymis eins og hann er uppsettur á ökutækinu, sem og til að gera söfnun útblásturssýna mögulega.

2.4.7.3. Fyrir sýnatöku úr agnamassa meðan á prófun stendur þegar kerfi sem endurnýjar sig er við stöðug álagsskilyrði (þ.e. ökutækið er ekki að ganga í gegnum endurnýjun) er mælst til að ökutækið hafi lokið > 1/3 af kílómetrasöfnun milli reglubundinnar endurnýjunar eða að kerfið sem endurnýjar sig reglulega hafi verið undir sambærilegu álagi frá ökutækinu.

2.5. Forprófunarlotur

Framkvæma má forprófunarlotur ef framleiðandinn óskar eftir því til að fylgja hraðaferlinu innan þeirra marka sem mælt er fyrir um.

2.6. Formeðhöndlun prófunarökutækis

2.6.1. Undirbúningur ökutækis

2.6.1.1. Áfylling eldsneytisgeymis

Eldsneytisgeyminn (eða eldsneytisgeymana) skal fylla með tilgreindu prófunareldsneyti. Ef eldsneytið, sem fyrir er í geyminum (eða eldsneytisgeymunum), er ekki í samræmi við forskriftirnar í lið 2.4.6 í þessum undirviðauka skal tappa því af áður en eldsneytisáfylling fer fram. Mengunarvarnabúnaður fyrir uppgufun skal hvorki tæmdur né fylltur með óeðlilegum hætti.

2.6.1.2. Hleðsla endurhlaðanlegra raforkugeymslukerfa

Endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi skulu fullhlaðin fyrir prófunarlotu fyrir formeðhöndlun. Að beiðni framleiðanda er heimilt að sleppa hleðslu á undan formeðhöndlun. Endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi skulu ekki hlaðin aftur fyrir opinbera prófun.

2.6.1.3. Þrýstingur í hjólbörðum

Stilla skal þrýsting í hjólbörðum drifhjóla í samræmi við lið 2.4.5 í þessum undirviðauka.

2.6.1.4. Ökutæki sem eru knúin með loftkenndu eldsneyti

Fyrir ökutæki með hreyfla með rafkveikju sem knúnir eru fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani eða þannig útbúnir að þeir geti verið knúnir með annað hvort bensíni eða fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani, skal ökutækið aftur formeðhöndlað á undan prófun á seinna viðmiðunareldsneyti á milli prófana á fyrsta loftkennda viðmiðunareldsneyti og seinna loftkennda viðmiðunareldsneyti. Fyrir ökutæki með hreyfla með rafkveikju sem knúnir eru fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani eða þannig útbúnir að þeir geti verið knúnir með annað hvort bensíni eða fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi/lífmetani, skal ökutækið aftur formeðhöndlað á undan prófun á seinna viðmiðunareldsneyti á milli prófana á fyrsta loftkennda viðmiðunareldsneyti og seinna loftkennda viðmiðunareldsneyti.

2.6.2. Prófunarklefi

2.6.2.1. Hitastig

Við formeðhöndlun skal hitastig í prófunarklefa vera eins og það er skilgreint fyrir prófun 1 (liður 2.2.2.1.1 í þessum undirviðauka).

2.6.2.2. Bakgrunnsmæling

Mælt með að keyra ökutæki sem hefur litla losun efnisagna í akstursslotu við stöðugar aðstæður við 120 km/klst. í 20 mínútur, að því er varðar formeðhöndlun prófunarbúnaðar í prófunarstöð þar sem við prófun á ökutæki sem hefur litla losun efnisagna kann að vera mengun efnaleifa úr fyrri prófun á ökutæki með mikla losun efnisagna. Lengri keyrsla og/eða keyrsla á meiri hraða er leyfileg fyrir formeðhöndlun sýnatökubúnaðar, ef þörf krefur. Gera skal bakgrunnsmælingar á þynningarröri, ef við á, eftir formeðhöndlun rörsins og áður en nokkur síðari prófun ökutækis fer fram.

2.6.3. Ferlið

2.6.3.1. Prófunarökutæki skal annað hvort ekið eða því ýtt upp á aflmæli og keyrt í gegnum viðeigandi WLTC-prófunarlotur. Ökutæki þurfa ekki að vera köld og þau má nota til að stilla álag á aflmæli.

2.6.3.2. Stilla skal álag á aflmæli í samræmi við 7. og 8. lið í 4. undirviðauka. Ef vegkefli í tvíhjóladrifsham er notað við prófun skal stillingin fyrir ökumótstöðu vera í notkun á vegkefli í tvíhjóladrifsham og ef vegkefli í fjórhjóladrifsham er notað við prófun skal stillingin fyrir ökumótstöðu vera í notkun á vegkefli í fjórhjóladrifsham.

2.6.4. Stjórnun ökutækis

2.6.4.1. Hefja skal ræsingarlotu aflrásar með þeim búnaði sem veittur er í þessum tilgangi samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda.

Skipting á vinnuham sem er hafinn án ökutækis meðan á prófun stendur skal ekki vera leyfileg nema annað sé tekið fram.

2.6.4.1.1. Ef ekki tekst að hefja ræsingarlotu aflrásar, t.d. ef hreyfillinn ræsist ekki eins og gert er ráð fyrir eða að ökutækið gefur upp skilaboð um villu við ræsingu, þá er prófunin ógild og endurtaka skal formeðhöndlunarprófanir og keyra nýja prófun.

2.6.4.1.2. Ef fljótandi jarðolíugas eða jarðgas/lífmetan er notað sem eldsneyti er leyfilegt að ræsa hreyfilinn með bensíni og skipta sjálfvirkt yfir í fljótandi jarðolíugas eða jarðgas/lífmetan eftir tímabil sem ökumaður getur ekki breytt. Slíkt tímabil skal ekki vera lengra en 60 sekúndur.

Einnig er leyfilegt að nota eingöngu bensín eða bensín samtímis með gasi við starfrækslu í gasham að því tilskildu að orkunotkun á gasi er yfir 80% af heildarmagni orkunotkunar við prófun 1. Þessi prósenta skal reiknuð út í samræmi við aðferðina sem sett er fram í 3. viðbæti við þennan undirviðauka.

2.6.4.2. Lotan hefst við upphaf ræsingarlotu aflrásar.

2.6.4.3. Keyra skal gildandi WLTC-prófunarlotu til formeðhöndlunar.

Að beiðni framleiðanda eða viðurkenningaryfirvalds má framkvæma frekari WLTC-prófunarlotur til þess að ökutæki og stjórnbúnaður þess komist í stöðugt ástand.

Tilgreina skal umfang slíkrar frekari formeðhöndlunar í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

2.6.4.4. Hröðun

Nota skal ökutækið með viðeigandi hreyfingu eldsneytisgjafar sem þörf er á til að fylgja hraðaferlinu nákvæmlega.

Keyra skal ökutækið snurðulaust og fylgja dæmigerðum hraða og aðferðum við gírskiptingar.

Ef handskiptingu er beitt skal eldsneytisgjöfinni sleppt við hverja gírskiptingu og gera skal gírskiptinguna á lágmarkstíma.

Ef ekki er hægt að fylgja hraðaferlinu með ökutæki skal það notað við mesta mögulega afl þar til hraði ökutækisins nær aftur viðkomandi markhraða.

2.6.4.5. Hraðaminnkun

Þegar verið er að minnka hraða í prófunarlotunni skal ökumaður minnka virkni á eldsneytisgjöf en tengslið skal ekki óvirkjað handvirkt fram að þeim punkti sem er tilgreindur í d-, e- eða f-lið 4. liðar 2. undirviðauka.

Ef hraði ökutækis minnkar fljótar en sem mælt er fyrir um í hraðaferli skal eldsneytisgjöf notuð þannig að ökutækið fylgi hraðaferlinu nákvæmlega.

Ef hraði ökutækis minnkar of hægt til að fylgja fyrirhugaðri hraðaminnkun skal beita hemlum þannig að hægt sé að fylgja hraðaferlinu nákvæmlega.

2.6.4.6. Beiting hemlanna

Í kyrrstæðum fasa eða lausagangsfasa skal beita hemlum með viðeigandi krafti til að koma í veg fyrir að drifhjólin snúist.

2.6.5. Notkun gírskiptingar

2.6.5.1. Handskipting

2.6.5.1.1. Fylgja skal forskriftum um gírskiptingar sem tilgreindar eru í 2. undirviðauka. Ökutækjum sem prófuð eru í samræmi við 8. undirviðauka skal ekið í samræmi við lið 1.5 í þeim undirviðauka.

2.6.5.1.2. Gírskipting skal hefjast og henni skal lokið innan við ±1,0 sekúndu frá þeim punkti gírskiptingar sem mælt er fyrir um.

2.6.5.1.3. Stíga skal á tengsli innan við ±1,0 sekúndu frá þeim notkunarpunkti tengslis sem mælt er fyrir um.

2.6.5.2. Sjálfskipting

2.6.5.2.1. Eftir fyrstu virkjun skal ekki nota gírstöngina meðan prófun stendur yfir. Fyrsta virkjun skal gerð einni sekúndu áður en fyrsta hröðun hefst.

2.6.5.2.2. Ökutæki með sjálfskiptingu sem hafa handvirkan ham skulu ekki prófuð í þeim ham.

2.6.6. Valkvæðir notkunarhamir

2.6.6.1. Ökutæki sem eru útbúin aðalham skulu prófuð í þeim ham. Að ósk framleiðanda má prófa ökutækið þess í stað með þeim valkvæða notkunarham sem er lakastur hvað varðar koltvísýringslosun.

2.6.6.2. Framleiðandi skal leggja fram sönnunargögn til viðurkenningaryfirvalds um að til staðar sé valkvæður notkunarhamur sem uppfyllir kröfurnar í lið 3.5.9 í þessum viðauka. Með samþykki viðurkenningaryfirvalds má nota aðalhaminn sem eina valkvæða notkunarhaminn í viðkomandi kerfi eða búnaði fyrir ákvörðun markgildalosunar, koltvísýringslosunar og eldsneytisnotkunar.

2.6.6.3. Ef ökutæki hefur engan aðalham eða viðurkenningarvald samþykkir ekki að aðalhamur sem óskað er eftir sé aðalhamur skal ökutækið prófað með besta valkvæða notkunarham og lakasta valkvæða notkunarham fyrir markgildalosun, koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun. Besti hamur og lakasti hamur skulu tilgreindir með sönnunargögnum sem lögð eru fram um koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun í öllum hömum. Koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun skulu vera meðalgildi niðurstaðna úr prófun í báðum hömum. Skrá skal niðurstöður úr prófun í báðum hömum.

Að ósk framleiðanda má prófa ökutækið þess í stað með valkvæðum notkunarham sem er lakastur hvað varðar koltvísýringslosun.

2.6.6.4. Á grundvelli tækniþekkingar sem framleiðandi leggur fram og með samþykki viðurkenningaryfirvalds skal ekki taka tillit til sérstakra valkvæðra notkunarhama sem ætlaðir eru fyrir mjög sérstakan takmarkaðan tilgang (t.d. viðhaldshamur, klifurhamur). Hafa skal í huga alla eftirstandandi valkvæða notkunarhami sem eru notaðir við akstur áfram og uppfylla skal mörkin fyrir markgildalosun í öllum þessum hömum.

2.6.6.5. Ákvæði liða 2.6.6.1 til 2.6.6.4 í þessum undirviðauka skulu gilda um öll kerfi í ökutækjum sem hafa valkvæða notkunarhami, þ.m.t. þau sem eiga ekki einvörðungu við um gírskiptinguna.

2.6.7. Prófun 1 gerð ógild og prófunarlotu lokið

Ef hreyfill stöðvast óvænt skal lýsa formeðhöndlun eða prófun 1 ógilda.

Slökkva skal á hreyfli eftir að prófunarlotunni er lokið. Ökutækið skal ekki endurræst þar til sú prófun hefst sem ökutækið hefur verið formeðhöndlað fyrir.

2.6.8. Nauðsynleg gögn og gæðastýring

2.6.8.1. Hraðamæling

Til að meta raunverulegan akstursþraða meðan á formeðhöndlun stendur skal hraðinn mældur út frá raunverulegum tíma eða hann fenginn með gagnasöfnunarkerfi á tíðni sem er ekki minni en 1 Hz.

2.6.8.2. Vegalengd sem farin er

Vegalengdin sem er raunverulega ekin skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum fyrir hvern fasa í WLTC-prófunarlotu.

2.6.8.3. Vikmörk hraðaferils

Ökutæki sem geta ekki náð hröðunar- og hámarkshraðamörkum sem krafist er í gildandi WLTC-prófunarlotu skulu látin vinna með fullri inngjöf eldsneytis þar til þau ná aftur því hraðaferli sem krafist er. Prófun skal ekki vera ógild vegna frávika frá hraðaferli við þessar aðstæður. Frávik frá akstursloţu skulu koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

2.6.8.3.1. Leyfa skal eftirfarandi vikmörk milli raunhraða ökutækis og hraða sem mælt er fyrir um í viðeigandi prófunarlotum.

Ekki skal sýna ökumanni vikmörkin:

a) Efri mörk: 2,0 km/klst. hærri en efsti hluti ferils innan ±1,0 sekúndu frá tilgreindum tímapunkti,

b) Lægri mörk: 2,0 km/klst. lægri en neðsti hluti ferils innan ±1,0 sekúndu frá tímapunkti.

Sjá Mynd A6/2.

Samþykkja skal vikmörk fyrir hraða sem eru meiri en þau sem mælt er fyrir um, að því gefnu að aldrei sé farið yfir vikmörkin sem nemur meira en 1 sekúndu í hverju tilviki.

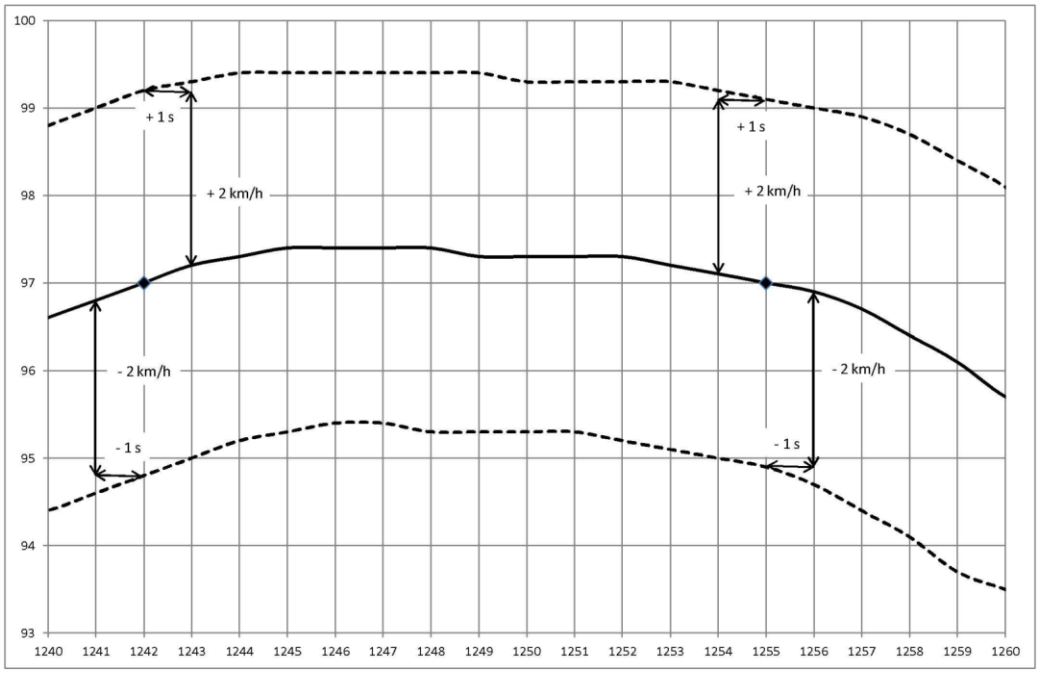
Það skulu ekki vera fleiri en 10 slík frávik í hverri prófunarlotu.

2.6.8.3.2. Reikna skal vísitölur fyrir akstursferil fyrir IWR og RMSSE í samræmi við kröfurnar í 7. lið í 7. undirviðauka.

Ef annaðhvort IWR eða RMSSE er utan við viðeigandi gildissvið skal akstursprófunin teljast ógild.

Mynd A6/2

Vikmörk hraðaferils



2.7. Varmajafnvægismeðhöndlun

2.7.1. Eftir formeðhöndlun og fyrir prófun skal ökutækið geymt á svæði með þeim umhverfisskilyrðum sem lýst er í lið 2.2.2.2 í þessum undirviðauka.

2.7.2. Ökutækið skal látið ná varmajafnvægi í að lágmarki 6 klukkustundir og að hámarki 36 klukkustundir með hlífina á vélarrýminu opna eða lokaða. Kælingu má ná fram með þvingaðri kælingu þar til prófunarhitastigi er náð, ef slíkt er ekki undanskilið með sértækum ákvæðum fyrir tiltekið ökutæki. Ef flýtt er fyrir kælingu með viftum skulu vifturnar staðsettar þannig að hámarkskælingu aflrásar, hreyfils og eftirmeðferðarkerfis fyrir útblástursloft sé náð á einsleitan hátt.

2.8. Prófun á losun og eldsneytisnotkun (prófun 1)

2.8.1. Hitastig í prófunarklefa við upphaf prófunar skal vera 23 °C ± 3 °C. Hitastig smurolíu og kælivökva, ef slíkt er fyrir hendi, skal vera innan ±2 °C frá 23 °C stillipunktinum.

2.8.2. Ýta skal prófunarökutæki á aflmæli.

2.8.2.1. Drifhjólum ökutækis skal komið fyrir á aflmælinum án þess að hreyfillinn sé ræstur.

2.8.2.2. Hjólbarðaþrýstingur drifhjóla skal stilltur í samræmi við ákvæði liðar 2.4.5 í þessum undirviðauka.

2.8.2.3. Loka skal hlíf á vélarrými.

2.8.2.4. Tengileiðsla fyrir útblástur skal tengd við útblástursrör ökutækisins rétt áður en hreyfill er ræstur.

2.8.3. Ræsing aflrásar og akstur

2.8.3.1. Hefja skal ræsingarlotu aflrásar með þeim búnaði sem veittur er í þessum tilgangi samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda.

2.8.3.2. Keyra skal ökutækið eins og lýst er í liðum 2.6.4 til 2.6.7 í þessum undirviðauka, í gegnum viðeigandi WLTC-prófunarlotu eins og lýst er í 1. undirviðauka.

2.8.4. Mæla skal RCB-gögn fyrir hvern fasa WLTC-prófunarlotu eins og skilgreint er í 2. viðbæti við þennan undirviðauka.

2.8.5. Taka skal sýni af raunhraða ökutækis með 10 Hz tíðni mælinga og reikna skal út og skrá vísitölur fyrir akstursferil sem lýst er í 7. lið í 7. undirviðauka.

2.8.6. Sýnið af raunhraða ökutækis sem er tekið með 10 Hz tíðni mælinga ásamt raunverulegum tíma skal notað við leiðréttingu á niðurstöðum úr prófun fyrir losun koltvísýrings út frá markhraða og markvegalengd eins og skilgreint er í 6. undirviðauka b.

2.9. Sýnataka loftkenndra efna

Safna skal loftkenndum sýnum í sekki og greina efnasambönd við lok prófunar eða prófunarfasa, eða greina má efnasambönd samfellt og tegra í gegnum alla prófunarlotuna.

2.9.1. Eftirfarandi ráðstafanir skulu gerðar á undan hverri prófun:

2.9.1.1. Hreinsaðir og tæmdir sýnatökusekkir skulu tengdir við söfnunarkerfið fyrir þynnt útblástursloft og þynningarloft.

2.9.1.2. Mælitæki skulu ræst í samræmi við fyrirmæli framleiðanda tækisins.

2.9.1.3. Varmaskiptir gassýnissafnara (sé hann uppsettur) skal forhitaður eða forkældur innan við vikmörk ganghita hans við prófun eins og tilgreint er í lið 3.3.5.1 í 5. undirviðauka.

2.9.1.4. Hita skal eða kæla íhluti á borð við sýnatökurásir, síur, kæla og dælur eftir þörfum þar til stöðgun ganghita er náð.

2.9.1.5. Stilla skal streymi gassýnissafnara í samræmi við lið 3.3.4 í 5. undirviðauka og stilla skal gegnumstreymi sýnis að viðeigandi stigum.

2.9.1.6. Allur rafrænn tegrunarbúnaður skal núllstilltur og má vera núllstilltur aftur áður en nokkur lotufasi hefst.

2.9.1.7. Velja skal viðeigandi styrkbil fyrir gasgreiningartæki sem starfa samfellt. Einungis má skipta þeim meðan á prófun stendur ef skiptin eru gerð með því að breyta þeirri kvörðun sem stafrænni upplausn mælitækisins er beitt á. Ekki má skipta mögnun hliðræns aðgerðamagnara í greiningartæki meðan á prófun stendur.

2.9.1.8. Öll greiningartæki sem starfa samfellt skulu núllstillt og kvörðuð með gasi sem uppfyllir kröfurnar í 6. lið 5. undirviðauka.

2.10. Sýnataka fyrir ákvörðun á agnamassa

2.10.1. Á undan hverri prófun skal gera þær ráðstafanir sem um getur í liðum 2.10.1.1 til 2.10.1.2.2 í þessum undirviðauka.

2.10.1.1. Val á síu

Nota skal eina sýnatökusíu fyrir agnir án varaeiningar fyrir heila viðeigandi WLTC-prófunarlotu. Til að greiða fyrir svæðisbundnum breytileikum á prófunarlotu má nota staka síu fyrir fyrstu þrjá fasana og aðra síu fyrir fjórða fasann.

2.10.1.2. Undirbúningur síu

2.10.1.2.1. Að minnsta kosti einni klukkustund fyrir prófun er síu komið fyrir í ræktunarskál, sem ver hana gegn mengun af völdum ryks og hefur greið loftskipti, og henni komið fyrir í vigtunarrými til að ná stöðugleika.

Að stöðgunartímabilinu loknu skal sían vigtuð og þyngd hennar skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum. Því næst skal sían geymd í lokaðri ræktunarskál eða lokuðum síuhaldara uns hennar er þörf við prófun. Nota skal síuna innan átta stunda frá því er hún er tekin úr vigtunarrýminu.

Síunni skal skilað aftur í stöðgunarrýmið innan einnar klukkustundar eftir prófun og hún skal meðhöndluð í a.m.k. eina klukkustund fyrir vigtun.

2.10.1.2.2. Sýnatökusía fyrir agnir skal vandlega sett upp í síuhaldara. Sían skal einungis meðhöndluð með töngum. Harkaleg meðferð á síu mun leiða til rangrar ákvörðunar á þyngd. Síuhaldarasamstæðan skal lögð í sýnatökurás sem hefur ekkert gegnumstreymi.

2.10.1.2.3. Mælt er með að örvog sé athuguð við upphaf hverrar vigtunar innan 24 klukkustunda eftir vigtun sýna með því að vigta einn hlut til viðmiðunar sem vegur u.þ.b. 100 mg. Vigta skal þennan hlut þrisvar sinnum og meðalgildi niðurstöðu skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum. Vigtunin og vogin teljast gild ef meðalgildi niðurstöðu vigtunar er ±5 μg af niðurstöðu fyrri vigtunar.

2.11. Sýnataka úr fjölda agna

2.11.1. Á undan hverri prófun skal gera þær ráðstafanir sem um getur í liðum 2.11.1.1. til 2.11.1.2 í þessum undirviðauka:

2.11.1.1. Þynningarkerfi og mælibúnaður sem eru sérhæfð fyrir efnisagnir skulu ræst og gerð tilbúin fyrir sýnatöku,

2.11.1.2. Staðfesta skal rétta starfsemi agnateljara og fjarlægingarbúnaðar fyrir rokgjarnar agnir sem tilheyra sýnatökukerfi fyrir agnir í samræmi við þær aðferðir sem eru tilgreindar í liðum 2.11.1.2.1 til 2.11.1.2.4 í þessum undirviðauka.

2.11.1.2.1. Athugun á leka skal gefa mældan styrk sem er lægri en 0,5 agnir á hvern cm^3 með notkun síu sem hefur viðeigandi frammistöðu og sem er fest við inntaksop alls agnamælikerfisins, fjarlægingarbúnaðar fyrir rokgjarnar agnir og teljara á fjölda efnisagna.

2.11.1.2.2. Hvern dag skal athugun á núllstillingu teljara fyrir fjölda efnisagna gefa styrk sem er $\leq 0{,}2$ agnir á hvern cm^3 með notkun síu, sem hefur viðeigandi frammistöðu, við inntaksop agnateljarans. Þegar sían er fjarlægð skal sjást aukning um a.m.k. 100 efnisagnir á hvern cm^3 af mældum styrk í agnateljarar þegar hann er notaður til að taka sýni úr andrúmslofti og til baka að $\leq 0{,}2$ ögnum á hvern cm^3 þegar síunni er skipt út.

2.11.1.2.3. Staðfesta skal að gefið sé til kynna í mælikerfinu að uppgufunarleiðslan hafi náð réttum ganghita, sé slík leiðsla til staðar í kerfinu.

2.11.1.2.4. Staðfesta skal að gefið sé til kynna í mælikerfinu að þynningarbúnaður PND_1 hafi náð réttum ganghita.

2.12. Sýnataka meðan á prófun stendur

2.12.1. Ræsa skal þynningarkerfi, sýnadælur og gagnaöflunarkerfi.

2.12.2. Ræsa skal sýnatökukerfi fyrir agnamassa og sýnatökukerfi fyrir fjölda agna.

2.12.3. Fjöldi agna skal mældur samfellt. Ákvarða skal meðalstyrkinn með því að tegra merki greiningartækisins í gegnum hvern fasa.

2.12.4. Sýnataka skal hefjast fyrir eða við upphaf ræsingarlotu aflrásar og ljúka við lok prófunarlotu.

2.12.5. Breyting á sýnatöku

2.12.5.1. Loftkennd losun

Ef nauðsyn krefur skal skipta sýnatöku úr þynntum útblæstri og þynningarlofti frá einu pari sýnatökusekkja til annars pars sýnatökusekkja við lok hvers fasa í þeirri viðeigandi WLTC-prófunarlotu sem ekin verður.

2.12.5.2. Agnamassi

Kröfurnar í lið 2.10.1.1 í þessum undirviðauka gilda.

2.12.6. Vegalengd aflmælis skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum fyrir hvern fasa.

2.13. Lok prófunar

2.13.1. Slökkva skal á hreyflinum strax að loknum síðasta hluta prófunar.

2.13.2. Slökkva skal á gassýnissafnara eða öðrum sogbúnaði eða aftengja skal útblásturspípu frá útblástursröri eða útblástursrörum ökutækis.

2.13.3. Fjarlægja skal ökutækið af aflmælinum.

2.14. Eftirprófunarferli

2.14.1. Athugun á greiningartæki fyrir lofttegundir

Athuga skal aflestrartölu fyrir núllstillingar- og kvörðunargas þeirra greiningartækja sem notuð eru fyrir samfellda mælingu. Prófunin skal teljast viðunandi ef mismunurinn milli þessara tveggja mælinga, fyrir og eftir prófun, er minni en 2% af gildi kvörðunargass.

2.14.2. Greining á sekkjum

2.14.2.1. Greina skal útblástursloft og þynningarloft úr sekkjum eins fljótt og auðið er. Í öllum tilvikum skal greina útblástursloft eigi síðar en 30 mínútum eftir lok lotufasans.

Taka skal tillit til tíma hvarfgirnis í gasi fyrir efnasambönd í sekknum.

2.14.2.2. Eins fljótt og hægt er fyrir greiningu skal núllstilla greiningartækin með viðeigandi núllstillingarlofttegund innan þess mælingasviðs sem nota á fyrir hvert efnasamband.

2.14.2.3. Kvörðunarferill greiningartækjanna skal stilltur með kvörðunargasi sem hefur nafnstyrk sem nemur 70–100% af viðkomandi mælisviði.

2.14.2.4. Því næst skal endurathuga núllstillingar greiningartækja: leiði nokkur aflestur í ljós meira en 2% frávik frá því mælingasviði sem ákveðið var samkvæmt lið 2.14.2.2 í þessum undirviðauka skal ferlið endurtekið fyrir það greiningartæki.

2.14.2.5. Því næst skal greina sýnin.

2.14.2.6. Eftir greininguna skulu núllpunktar og kvörðunarpunktar endurathugaðir með sömu gösum og áður. Prófunin skal teljast viðunandi ef mismunurinn er minni en 2% af gildi kvörðunargass.

2.14.2.7. Streymi og þrýstingur hinna ýmsu gastegunda gegnum greiningartækin skal vera það sama og notað er við kvörðun greiningartækjanna

2.14.2.8. Innihald hvers mælds efnasambands skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum eftir stöðgun mælitækisins.

2.14.2.9. Reikna skal út massa og magn allrar losunar, eftir atvikum, í samræmi við 7. undirviðauka.

2.14.2.10. Framkvæma skal kvarðanir og athuganir annað hvort:

a) Fyrir og eftir hverja greiningu á pari sekkja eða

b) fyrir og eftir heila prófun.

Í tilviki b-liðar skulu kvarðanir og athuganir framkvæmdar á öllum greiningartækjum fyrir öll sviðin sem notuð eru við prófunina.

Í tilviki bæði a- og b-liðar skal nota sama mælisvið greiningartækis fyrir samsvarandi sekki fyrir andrúmsloft og útblástur.

2.14.3. Vigtun agnasýnatökusía

2.14.3.1. Sýnatökusíu fyrir agnir skal skilað aftur í vigtunarrýmið ekki síðar en einni klukkustund eftir að prófuninni lýkur. Hún skal meðhöndluð á ræktunarskál, sem er varin gegn mengun af völdum ryks og hefur loftskipti, í a.m.k. eina klukkustund og síðan vigtuð. Heildarþyngd síunnar skal tilgreind í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

2.14.3.2. Vigta skal a.m.k. tvær ónotaðar en vigtaðar viðmiðunarsíur innan átta klukkustunda frá vigtun sýnasíanna en æskilegt er þó að það sé gert samtímis. Viðmiðunarsíurnar skulu vera af sömu stærð og úr sama efni og sýnasían.

2.14.3.3. Ef tiltekin þyngd viðmiðunarsíu breytist um meira en ±5 µg á milli vigtana á sýnasíum skulu sýnasíur og viðmiðunarsíur endurmeðhöndlaðar í vigtunarrými og vigtaðar að nýju.

2.14.3.4. Samanburðurinn á vigtun viðmiðunarsía skal gerður á milli tiltekinna þyngda og hlaupandi meðalgildis tiltekinna þyngda viðkomandi viðmiðunarsíunnar. Hlaupandi meðalgildi skal reiknað út frá tilteknum þyngdum sem safnast á tímabilinu frá því að viðmiðunarsíur voru settar inn í vigtunarrýmið. Meðaltíminn skal vera minnst einn dagur en ekki lengri en 15 dagar.

2.14.3.5. Leyfilegt er að endurmeðhöndla og endurvigta sýna- og viðmiðunarsíur mörgum sinnum þar til 80 klst. eru liðnar eftir mælingu lofttegunda frá losunarprófun. Ef meira en helmingur af fjölda viðmiðunarsía uppfylla ± 5 µg viðmiðunina á undan eða á þeim punkti þegar 80 klukkustundir eru liðnar getur vigtun sýnasíu talist gild. Ef tvær viðmiðunarsíur eru notaðar og önnur uppfyllir ekki ±5 µg viðmiðunina á þeim punkti þegar 80 klukkustundir eru liðnar getur vigtun sýnasíu talist gild að uppfylltu því skilyrði að summa tölulegs mismunar á milli tiltekins og hlaupandi meðaltals frá báðum viðmiðunarsíum skal vera minni en eða jöfn 10 µg.

2.14.3.6. Í tilvikum þar sem minna en helmingur viðmiðunarsía uppfyllir ±5 µg viðmiðunina skal viðmiðunarsíu hent og losunarprófun endurtekin. Öllum viðmiðunarsíum skal hent og skipt út innan 48 klst. Í öllum öðrum tilvikum skal viðmiðunarsíum skipt út a.m.k. á 30 daga fresti og með þeim hætti að engin sýnasía sé vigtuð án samanburðar við viðmiðunarsíu sem hefur verið í vigtunarrými í a.m.k. einn dag.

2.14.3.7. Ef viðmiðanirnar, sem settar eru fram í lið 4.2.2.1 í 5. undirviðauka, um stöðugleika vigtunarrýmis eru ekki uppfylltar, en vigtun viðmiðunarsía stenst framangreindar viðmiðanir, getur ökutækjaframleiðandinn valið hvort hann samþykkir þyngd sýnasíanna eða lætur ógilda prófanirnar, lagar stjórnbúnað vigtunarrýmisins og endurtekur prófunina.

———

6. undirviðauki - 1. viðbætir

Prófunaraðferð fyrir losun fyrir öll ökutæki búin kerfum sem endurnýja sig reglubundið

1. Almenn atriði

1.1. Í þessum viðbæti eru skilgreind sértæk ákvæði varðandi prófun á ökutæki búnu kerfum sem endurnýja sig reglubundið eins og skilgreint er í lið 3.8.1 í þessum viðauka.

1.2. Losunarstaðlar gilda ekki nauðsynlega í lotum þegar endurnýjun á sér stað. Ekki er þörf á sérstakri prófunaraðferð ef reglubundin endurnýjun á sér stað að minnsta kosti einu sinni meðan á prófun 1 stendur og hefur átt sér stað a.m.k. einu sinni meðan á undirbúningi ökutækisins stendur eða ef vegalengdin á milli þess að reglubundin endurnýjun á sér stað tvisvar í röð felur í sér meiri en 4000 km af endurtekinni keyrslu á prófun 1. Í þessu tilviki á viðbætirinn ekki við og nota skal K_i stuðulinn 1,0.

1.3. Ákvæði þessa viðbætis skulu aðeins gilda að því er varðar mælingar á agnamassa og ekki til mælingar á agnafjölda.

1.4. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins þarf prófunaraðferðin, sem á sérstaklega við kerfi sem endurnýjar sig reglubundið, ekki að gilda um endurnýjunarbúnað ef framleiðandinn lætur í té gögn sem sýna að á meðan á lotum stendur þar sem endurnýjun á sér stað er losun innan marka fyrir viðkomandi ökutækjaflokk. Í þessu tilviki skal nota fast 1,05 K_i gildi fyrir koltvísýringslosun og eldsneytisnotkun.

1.5. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins má undanskilja hæsta fasann til að ákvarða endurnýjunarstuðulinn K_i fyrir ökutæki í flokkum 2 og 3.

2. Prófunaraðferð

Prófunarökutækið skal geta hamlað eða heimilað endurnýjunarferlið svo fremi að þessi aðgerð hafi engin áhrif á upphaflega kvörðun hreyfilsins. Forvarnir gegn endurnýjun eru aðeins heimilaðar á meðan á hleðslu endurnýjunarkerfisins stendur og á meðan formeðhöndlunarlotur eiga sér stað. Þær eru ekki heimilaðar meðan á mælingum á losun í endurnýjunarfasa stendur. Losunarprófunin skal framkvæmd með óbreyttri stýrieiningu frá framleiðanda upprunalegs búnaðar. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins má nota tæknilega eftirlitseiningu sem hefur engin áhrif á upphaflega kvörðun hreyfils, á meðan ákvörðun K_i stendur.

2.1. Mæling á losun með útblæstri milli tveggja WLTC-prófunarlota þar sem endurnýjun fer fram

2.1.1. Meðalgildi losunar á milli endurnýjana og meðan á hleðslu endurnýjunarbúnaðar stendur skal ákvarðað út frá meðaltali niðurstaðna úr nokkrum prófunun 1, með nánast jafn löngu millibili (ef þær eru fleiri en tvær). Einnig er framleiðanda heimilt að leggja fram gögn sem sýna að losunin helst stöðug (±15%) í WLTC-prófunarlotum á milli endurnýjana. Í því tilviki er heimilt að nota losun sem mæld er í prófun 1. Í öllum öðrum tilvikum skal ljúka mælingum á losun með a.m.k. tveimur lotum af prófun 1: einni strax eftir endurnýjun (áður en ný hleðsla á sér stað) og einni eins nálægt endurnýjunarfasa og hægt er. Allar losunarmælingar skulu framkvæmdar í samræmi við þennan undirviðauka og allir útreikningar skulu framkvæmdir í samræmi við 3. lið þessa viðbætis.

2.1.2. Hleðsluferlið og ákvörðunin á K_i skulu gerð á meðan akstursslotu 1 stendur á vegkefli eða þá í hreyfilprófunarbekk með sambærilegri prófunarlotu. Þessar lotur má keyra samfellt (þ.e. án þess að það þurfi að slökkva á hreyfli á milli lota). Eftir að tilteknum fjölda lota er lokið má fjarlægja ökutækið af vegkeflinu og halda prófun áfram síðar. Óski framleiðandi þess, og með samþykki viðurkenningaryfirvalds, er framleiðanda heimilt að þróa aðra aðferð og sýna fram á jafngildi hennar, þ.m.t. hitastig síunnar, lestunarmagn og vegalengdina sem ekin er. Þetta má gera á hreyfilprófunarbekk eða á vegkefli.

2.1.3. Fjöldi lota D milli tveggja WLTC-prófunarlota þar sem endurnýjun á sér stað, fjöldi lota þar sem losunarmælingar eiga sér stað (n) og mæling á massalosun M'_{sij} fyrir hvert efnasamband i í hverri lotu j skal koma fram á öllum viðeigandi prófunarblöðum.

2.2. Mælingar á losun meðan á endurnýjun stendur

2.2.1. Hægt er að ljúka undirbúningi ökutækis fyrir losunarprófun meðan á endurnýjunarfasa stendur, ef þörf krefur, með því að nota formeðhöndlunarloturnar sem kveðið er á um í lið 2.6 í þessum undirviðauka eða með sambærilegum lotum í hreyfilprófunarbekk, með hliðsjón af hleðsluskilyrðum sem valin hafa verið í lið 2.1.2 í þessum viðbæti.

2.2.2. Prófunarskilyrði og ökutækjaskilyrði fyrir prófun 1 sem lýst er í þessum viðauka gilda áður en fyrsta gilda losunarprófun er framkvæmd.

2.2.3. Endurnýjun skal ekki eiga sér stað meðan á undirbúningi ökutækis stendur. Hægt er að tryggja þetta með því að beita einni af eftirfarandi aðferðum:

2.2.3.1. Koma má fyrir „eftirlíkingu“ af endurnýjunarkerfi eða hluta þess áður en formeðhöndlunarlotur eiga sér stað.

2.2.3.2. Einhverri annarri aðferð sem framleiðandi og viðurkenningaryfirvald samþykkja sín á milli.

2.2.4. Framkvæma skal prófun á losun með útblæstri eftir kaldræsingu ásamt endurnýjunarferli í samræmi við viðeigandi WLTC-prófunarlotu.

2.2.5. Ef endurnýjunarferlið krefst fleiri en einnar WLTC-prófunarlotu skal ljúka hverri WLTC-prófunarlotu. Leyfilegt er að nota eina agnasýnatökusíu fyrir þær mörgu lotur sem þarf til að ljúka endurnýjunarferlinu.

Ef það þarf fleiri en eina WLTC-prófunarlotu skal keyra næstu WLTC-prófunarlotu eða -lotur strax á eftir, án þess að slökkt sé á hreyfli, þar til algjör endurnýjun hefur átt sér stað. Ef þörf er fleiri sekkjum fyrir losun lofttegunda fyrir margar lotur en sá fjöldi sekkja sem tiltækur er, skal sá tími sem nauðsynlegur er til að setja upp nýja prófun vera eins stuttur og mögulegt er. Á meðan á þessu tímabili stendur skal ekki slökkva á hreyflinum.

2.2.6. Reikna skal losunargildin út á meðan endurnýjun M_{ri} stendur fyrir hvert efnasamband i í samræmi við 3. lið þessa viðbætis. Fjöldi viðeigandi prófunarlota d sem mældar eru fyrir algjöra endurnýjun skulu koma fram á öllum viðeigandi prófunarblöðum.

3. Útreikningar

3.1. Útreikningur á losun með útblæstri og losun koltvísýrings og eldsneytisnotkun frá einlotu endurnýjunarkerfi

$$M_{si} = \frac{\sum_{j=1}^{n} M'_{sij}}{n} \text{ fyrir } n \geq 1$$

$$M_{ri} = \frac{\sum_{j=1}^{d} M'_{rij}}{d} \text{ fyrir } d \geq 1$$

$$M_{pi} = \frac{M_{si} \times D + M_{ri} \times d}{D + d}$$

þar sem tekið er tillit til hvers efnasambands i:

M'_{sij} er massalosun efnasambands i í prófunarlotu j án endurnýjunar, í g/km,

M'_{rij} er massalosun efnasambands i í prófunarlotu j meðan endurnýjun á sér stað, g/km (ef d > 1 skal fyrsta WLTC-prófunarlotan keyrð í köldu ástandi og eftirfarandi lotur í heitu ástandi),

M_{si} eru meðalgildi massalosunar efnasambands i án endurnýjunar, í g/km,

M_{ri} eru meðalgildi massalosunar efnasambands i meðan á endurnýjun stendur, í g/km,

M_{pi} eru meðalgildi massalosunar efnasambands i, í g/km,

n er fjöldi prófunarlota, milli lota þar sem endurnýjun á sér stað, þar sem losunarmælingar á WLTC-prófunarlotu af gerð 1 eru gerðar, ≥ 1,

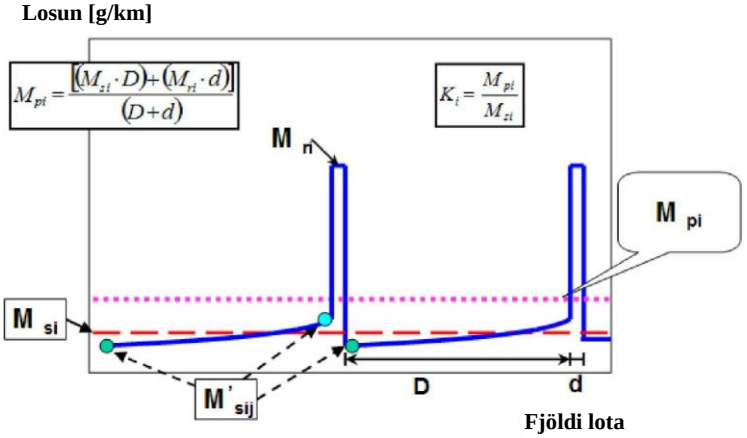
d er fjöldi heilla viðeigandi prófunarlota sem þarf til endurnýjunar,

D er fjöldi heilla viðeigandi prófunarlota milli tveggja lota þar sem endurnýjun fer fram.

Útreikningur á M_{pi} er sýndur myndrænt á mynd A6.viðb.1/1.

Mynd A6.viðb.1/1

Þættir sem mældir eru við losunarprófun meðan á lotum þar sem endurnýjun á sér stað stendur og á milli þeirra (dæmi til skýringar – losun meðan á „D“ stendur getur aukist eða minnkað)



3.1.1. Útreikningur á endurnýjunarstuðli K_i þar sem tekið er tillit til hvers efnasambands i.

Framleiðandinn getur valið að ákvarða annaðhvort viðbótarfráviksgildi eða margfaldandi stuðla sjálfstætt fyrir hvert efnasamband.

K_i stuðull: $$K_i = \frac{M_{pi}}{M_{si}}$$

K_i fráviksgildi: $K_i = M_{pi} - M_{si}$

Niðurstöður fyrir M_{si}, M_{pi} og K_i og val framleiðanda á gerð stuðuls skal skrásett. Niðurstaða fyrir K_i skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum. Niðurstöður M_{si}, M_{pi} og K_i skulu koma fram á öllum viðeigandi prófunarblöðum.

Ákvarða má K_i eftir að lokið hefur verið við staka endurnýjunarröð sem tekur til mælinga fyrir, á meðan og eftir að endurnýjun á sér stað eins og sýnt er á mynd A6.viðb.1/1.

3.2. Útreikningur á losun með útblæstri, losun koltvísýrings og eldsneytisnotkun fjöllotukerfa sem endurnýja sig reglubundið

Eftirfarandi skal reiknað út fyrir eina prófunarlotu 1 fyrir markgildalosun og koltvísýringslosun. Koltvísýringslosunin sem er notuð við þann útreikning skal stafa frá þrepi nr. 3 sem lýst er í töflu A7/1 í 7. undirviðauka.

$$M_{sik} = \frac{\sum_{j=1}^{n_k} M'_{sik,j}}{n_k} \text{ fyrir } n_j \geq 1$$

$$M_{rik} = \frac{\sum_{j=1}^{d_k} M'_{rik,j}}{d_k} \text{ fyrir } d \geq 1$$

$$M_{si} = \frac{\sum_{k=1}^{x} M_{sik} \times D_k}{\sum_{k=1}^{x} D_k}$$

$$M_{ri} = \frac{\sum_{k=1}^{x} M_{rik} \times d_k}{\sum_{k=1}^{x} d_k}$$

$$M_{pi} = \frac{M_{si} \times \sum_{k=1}^{x} D_k + M_{ri} \times \sum_{k=1}^{x} d_k}{\sum_{k=1}^{x} (D_k + d_k)}$$

$$M_{pi} = \frac{\sum_{k=1}^{x} (M_{sik} \times D_k + M_{rik} \times d_k)}{\sum_{k=1}^{x} (D_k + d_k)}$$

K_i stuðull: $$K_i = \frac{M_{pi}}{M_{si}}$$

K_i fráviksgildi: $K_i = M_{pi} - M_{si}$

þar sem:

M_{si} er meðalgildi massalosunar efnasambands i fyrir öll tilfelli k án endurnýjunar, g/km,

M_{ri} er meðalgildi massalosunar efnasambands i fyrir öll tilfelli k meðan á endurnýjun stendur, g/km,

M_{pi} er meðalgildi massalosunar efnasambands i fyrir öll tilfelli k, g/km,

M_{sik} er meðalgildi massalosunar efnasambands i fyrir öll tilfelli k án endurnýjunar, g/km,

M_{rik} er meðalgildi massalosunar efnasambands i fyrir tilfelli k meðan á endurnýjun stendur, g/km,

$M'_{sik,j}$ er massalosun efnasambands i fyrir tilfelli k í g/km án endurnýjunar sem mæld er við punkt j þar sem $1 \leq j \leq n_k$, g/km,

$M'_{rik,j}$ er massalosun efnasambands i fyrir tilfelli k meðan á endurnýjun stendur (þegar j > 1, þegar fyrsta prófun 1 er keyrð köld og loturnar sem koma á eftir heitar), mæld við prófunarlotu j þar sem $1 \leq j \leq d_k$, g/km,

n_k er fjöldi heilla prófunarlota fyrir tilfelli k, milli tveggja lotna þar sem endurnýjunarfasar eiga sér stað og þar sem losunarmælingar (gerð 1 WLTC-prófunarlotu eða sambærilegar lotur í hreyfilprófunarbekk) eru gerðar, ≥ 2,

d_k er fjöldi heilla viðeigandi prófunarlota fyrir tilfelli k sem þarf fyrir algjöra endurnýjun,

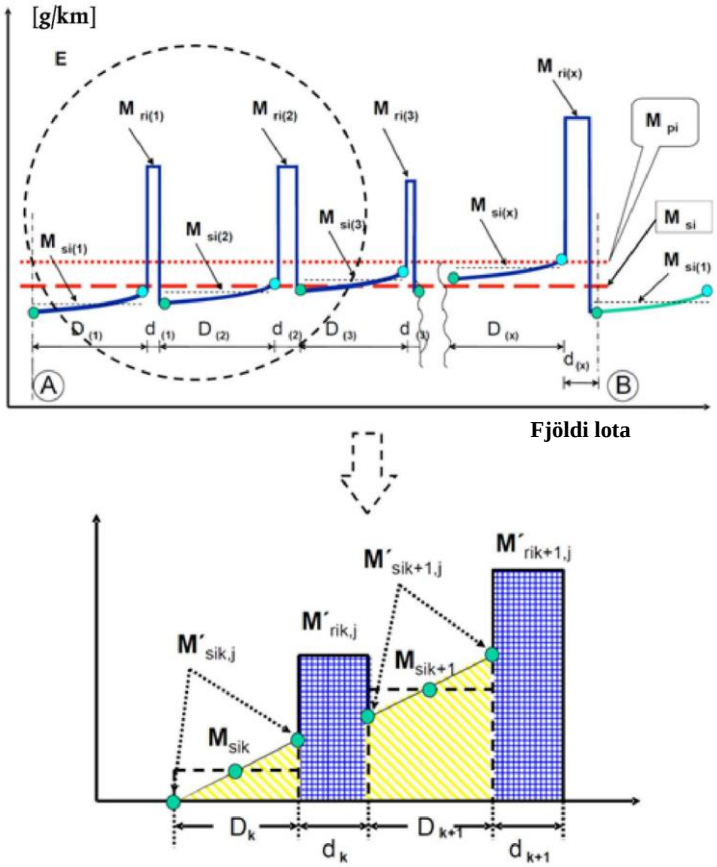
D_k er fjöldi viðeigandi prófunarlota fyrir tilfelli k á milli tveggja lotna þar sem endurnýjunarfasar eiga sér stað,

x er fjöldi heilla endurnýjana.

Útreikningur á M_{pi} er sýndur myndrænt á mynd A6.viðb.1/2.

Mynd A6.viðb.1/2

Þættir sem mældir eru við losunarprófun meðan á lotum þar sem endurnýjun á sér stað stendur og á milli þeirra (dæmi til skýringar)



Útreikningur á K_i fyrir fjöllotu kerfi sem endurnýja sig reglubundið er aðeins mögulegur eftir tiltekinn fjölda endurnýjana fyrir hvert kerfi.

Þegar búið er að framkvæma aðferðina að fullu (A til B, sjá mynd A6.viðb.1/2) ætti að vera hægt að ná upphaflegu skilyrði A aftur.

3.3. K_i-stuðlar (margfaldandi eða samleggjandi) skulu námundaðir að fjórum aukastöfum á grundvelli efnislegrar einingar fyrir staðalgildi losunar

6. undirviðauki - 2. viðbætir

Prófunaraðferð fyrir vöktun á endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi

1. Almenn atriði

Ef tvinnrafökutæki sem eru ekki ætluð fyrir ytri hleðslu (NOVC-HEV) og tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu (OVC-HEV) eru prófuð, skulu 2. og 3. viðbætir 8. undirviðauka gilda.

Í þessum viðbæti eru skilgreind sértæk ákvæði varðandi leiðréttingu á niðurstöðum úr prófun fyrir massalosun koltvísýrings sem fall af orkujöfnuði ΔE_{REESS} fyrir öll endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfin.

Leiðrétt gildi fyrir massalosun koltvísýrings skulu samsvara núllgildi orkujafnaðar ($\Delta E_{REESS} = 0$) og skulu reiknuð út með leiðréttingarstuðli sem ákvarðaður er eins og skilgreint er hér að neðan.

2. Mæli- og tækjabúnaður

2.1. Mæling á straumi

Afhleðsla endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins skal skilgreind sem neikvæður straumur.

2.1.1. Mæla skal straum á endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu meðan á prófunum stendur með því að nota straumferjald með klemmu eða lokað straumferjald. Straummælingakerfið skal uppfylla þær kröfur sem tilgreindar eru í töflu A8/1. Straumferjaldið skal geta meðhöndlað toppstrauma við ræsingu hreyfils og hitaskilyrði á mælistaðnum.

Framkvæma skal núllstillingu og afseglun á undan prófuninni í samræmi við fyrirmæli framleiðanda tækisins í því skyni að fá nákvæma mælingu.

2.1.2. Straumferjöldum skal komið fyrir í hvaða endurhlaðanlega raforkugeymslukerfi sem er á einum af köplunum sem tengdir eru beint í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið og skulu innihalda heildarstraum endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins.

Ef um er að ræða varða kapla skal beita viðeigandi aðferðum í samræmi við fyrirmæli viðurkenningaryfirvaldsins.

Til að auðvelda mælingu straums á endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu með ytri mælibúnaði ættu framleiðendur helst að útbúa viðeigandi, örugga og aðgengilega tengistaði á ökutækinu. Ef það er ekki hægt skal framleiðandinn veita viðurkenningaryfirvaldinu aðstoð með því að bjóða upp á úrræði til að tengja straummælibreytinn við endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið á þann hátt sem lýst er hér að framan.

2.1.3. Mældur straumur skal tegraður yfir tímabil á 20 Hz-lágmarkstíðni sem gefur mæligildið Q, gefið upp í amperstundum Ah. Mældur straumur skal tegraður yfir tímabil sem gefur mæligildið Q, gefið upp í amperstundum, Ah. Tegrunin getur átt sér stað í straummælingakerfinu.

2.2. Gögn úr innbyggðu greiningarkerfi ökutækis

2.2.1. Að öðrum kosti skal straumurinn í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu ákvarðaður með því að nota gögn sem byggð eru á ökutækjum. Eftirfarandi upplýsingar skulu vera aðgengilegar úr prófunarökutækinu til að nota megi þessa mæliaðferð:

a) Tegrað hleðslustöðugildi frá síðustu ræsingu keyrð í Ah,

b) tegrað hleðslustöðugildi í innbyggða greiningarkerfinu reiknað út á lágmarksúrtakstíðninni 5 Hz,

c) hleðslustöðugildi í gegnum tengi í innbyggða greiningarkerfinu eins og lýst er í SAE J1962.

2.2.2. Framleiðandinn skal sýna viðurkenningaryfirvaldinu fram á nákvæmni innbyggða greiningarkerfisins að því er varðar hleðslu- og losunargögn endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins.

Framleiðandinn getur komið á fót ökutækjahóp til að vakta endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið til að sanna að gögn innbyggða greiningarkerfisins um hleðslu og losun endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins séu rétt. Sýna skal fram á nákvæmni gagna á dæmigerðu ökutæki.

Eftirfarandi viðmiðanir fyrir hreyflahóp skulu gilda:

a) Einkvæm brunaaðferð (þ.e. rafkveikju-, þjöppukveikju-, tvígengis-, fjórgengishreyfill),

b) einkvæm hleðsla og/eða aðferð við endurheimt (hugbúnaðareining fyrir gögn úr endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu),

c) tiltækileiki gagna um borð,

d) einkvæmt hleðslujafnvægi sem mælt er af gagnaeiningu endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins,

e) einkvæm jafnvægishermun innbyggða hleðslutækisins.

2.2.3. Öll endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi sem hafa engin áhrif á massa koltvísýringslosunar skulu undanskilin frá vöktun.

3. Leiðréttingaraðferð á grundvelli orkubreytingar endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins

3.1. Mæling straums í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu skal hefjast um leið og prófun hefst og ljúka um leið og ökutækinu hefur verið ekið heila akturslotu.

3.2. Rafhleðslujafnvægi Q sem mælt er í rafveitukerfinu skal notað sem mæling á mismun milli orkuinnihalds endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis ökutækisins við lok lotunnar og við upphaf hennar. Ákvarða skal hleðslujafnvægið fyrir alla keyrðu WLTC-prófunarlotuna.

3.3. Skrá skal einstök gildi fyrir Q_{phase} í keyrðu lotufösunum.

3.4. Leiðrétting á massalosun koltvísýrings yfir alla lotuna sem fall af leiðréttingarviðmiðun c

3.4.1. Útreikningur á leiðréttingarviðmiðun c

Leiðréttingarviðmiðun c er hlutfallið milli algildis raforkubreytingar $\Delta E_{REESS,j}$ og eldsneytisorkunnar og skal reiknað út með eftirfarandi jöfnum:

$$c = \left|\frac{\Delta E_{REESS,j}}{E_{fuel}}\right|$$

þar sem:

c er leiðréttingarviðmiðunin,

$\Delta E_{REESS,j}$ er rafaflsbreyting allra endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfanna yfir tímabil j, ákvörðuð í samræmi við lið 4.1 í þessum viðbæti, Wh,

j er, í þessum lið, viðeigandi WLTP-prófunarlota í heild sinni,

E_{Fuel} er eldsneytisorkan reiknuð út með eftirfarandi jöfnu:

$$E_{fuel} = 10 \times HV \times FC_{nb} \times d$$

þar sem:

E_{fuel} er orkuinnihald þess eldsneytis sem notað er í viðeigandi WLTP-prófunarlotu, Wh,

HV er varmagildi í samræmi við töflu A6.viðb.2/1, kWh/l,

FC_{nb} er ójöfnuð eldsneytisnotkun í prófun 1 sem er ekki leiðrétt að því er varðar orkujafnvægi, sem ákvörðuð er í samræmi við 6. lið 7. undirviðauka og með því að nota niðurstöðurnar úr markgildalosun og koltvísýringslosun sem eru reiknaðar út í 2. þrepi í töflu A7/1, í l/100 km,

d er ekin vegalengd í samsvarandi viðeigandi WLTP-prófunarlotu, km,

10 breytistuðull í Wh.

3.4.2. Beita skal leiðréttingunni ef ΔE_{REESS} er neikvætt (samsvarar afhleðslu endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins) og leiðréttingarviðmiðun c sem er reiknuð í samræmi við lið 3.4.1 í þessum viðbæti er hærri en gildandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A6.viðb.2/2.

3.4.3. Sleppa skal leiðréttingunni og óleiðrétt gildi skulu notuð ef leiðréttingarviðmiðun c sem er reiknuð í samræmi við lið 3.4.1 í þessum viðbæti er minni en gildandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A6.viðb.2/2.

3.4.4. Sleppa má leiðréttingu og nota má óleiðrétt gildi ef:

a) ΔE_{REESS} er jákvætt (samsvarar hleðslu endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins) og leiðréttingarviðmiðun c sem er reiknuð í samræmi við lið 3.4.1 í þessum viðbæti er hærri en gildandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A6.viðb.2/2,

b) framleiðandinn getur sannað fyrir viðurkenningaryfirvaldinu með mælingu að það sé engin tenging milli ΔE_{REESS} og massalosunar koltvísýrings annars vegar og ΔE_{REESS} og eldsneytisnotkunar hins vegar.

Tafla A6.viðb.2/1

Orkuinnihald eldsneytis

Eldsneyti	Bensín							Dísilolía				
Innihald etanóls/lífdísilolíu, í %			E10			E85				B7		
Varmagildi (kWh/l)			8,64			6,41				9,79		

Tafla A6.viðb.2/2

Viðmiðunarmörk leiðréttingar fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis (RCB)

Lota	Lág + meðal	lág + meðal + há	lág + meðal + há + mjög há
Viðmiðunarmörk fyrir leiðréttingarviðmiðun c	0,015	0,01	0,005

4. Beiting leiðréttingarhams

4.1. Til að beita leiðréttingarhamnum skal reikna út rafaflsbreytinguna $\Delta T_{REESS,j}$ á tímabilinu j af öllum endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfunum út frá mældum rafstraumi og nafnspennu:

$$\Delta E_{REESS,j} = \sum_{i=1}^{n} \Delta E_{REESS,j,i}$$

þar sem:

$\Delta E_{REESS,j,i}$ er rafaflsbreytingin í endurhlaðanlega raforkugeymslukerfinu i á viðkomandi tímabili j, í Wh,

og:

$$\Delta E_{REESS,j,i} = \frac{1}{3\,600} \times U_{REESS} \times \int_{t_0}^{t_{end}} I(t)_{j,i} dt$$

þar sem:

U_{REESS} er málspenna endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins ákvörðuð í samræmi við IEC 60050-482, í V,

$I(t)_{j,i}$ er rafstraumur endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis i á viðkomandi tímabili j sem ákvarðaður er í samræmi við 2. lið í þessum viðbæti, í A,

t_0 er tíminn við upphaf viðkomandi tímabils j, í s,

t_{end} er tíminn við lok viðkomandi tímabils j, í s.

i er skrárnúmer viðkomandi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis,

n er heildarfjöldi endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfanna,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi tímabil, þar sem eitt tímabil skal vera hvaða viðeigandi lotufasi sem er, samsetning lotufasa og viðeigandi heildarlota,

$\frac{1}{3\,600}$ er breytistuðullinn frá Ws til Wh.

4.2. Til að leiðrétta massalosun koltvísýrings, g/km, skal nota sértæka Willans-stuðla fyrir brennsluferli úr töflu A6.viðb.2/3.

4.3. Leiðréttingin skal framkvæmd og henni beitt á heildarlotuna og fyrir hvern lotufasa fyrir sig og hún skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

4.4. Fyrir þennan sértæka útreikning skal nota fasta nýtni riðstraumsrafala fyrir raforkukerfi:

$\eta_{alternator}$ = 0,67 fyrir riðstraumsrafala fyrir raforkukerfi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis

4.5. Mismunur massalosunar koltvísýrings sem hlýst þar af fyrir umrætt tímabil j vegna álagshegðunar riðstraumsrafalans til að hlaða endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið skal reiknaður út með eftirfarandi jöfnu:

$$\Delta M_{CO2,j} = 0{,}0036 \times \Delta E_{REESS,j} \times \frac{1}{\eta_{alternator}} \times Willans_{factor} \times \frac{1}{d_j}$$

þar sem:

$\Delta M_{CO2,j}$ er mismunur massalosunar koltvísýrings sem hlýst þar af á tímabilinu j, í g/km,

$\Delta E_{REESS,j}$ er orkubreyting endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins á umræddu tímabili j, reiknuð út í samræmi við lið 4.1 í þessum viðbæti, í Wh,

d_j er sú fjarlægð sem ekin er á viðkomandi tímabili j, í km,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi tímabil, þar sem eitt tímabil skal vera hvaða viðeigandi lotufasi sem er, samsetning lotufasa og viðeigandi heildarlota,

0,0036 er breytistuðullinn frá Wh yfir í MJ,

$\eta_{alternator}$ er skilvirkni riðstraumsrafalans í samræmi við lið 4.4 í þessum viðbæti,

$Willans_{factor}$ er sértækur Willans-stuðull fyrir brennsluferlið eins og skilgreint er í töflu A6.viðb.2/3, í gCO_2/MJ.

4.5.1. Koltvísýringsgildin fyrir hvern fasa og heildarlotuna skulu leiðrétt eins og hér segir:

$M_{CO2,p,3} = M_{CO2,p,1} - \Delta M_{CO2,j}$

$M_{CO2,c,3} = M_{CO2,c,2} - \Delta M_{CO2,j}$

þar sem:

$\Delta M_{CO2,j}$ er niðurstaðan úr lið 4.5 í þessum viðbæti á tímabili j, í g/km.

4.6. Til að leiðrétta koltvísýringslosun, g/km, skal nota Willans-stuðlana í töflu A6.viðb.2/3.

Tafla A6.viðb.2/3

Willans-stuðlar

			Innsog	Þrýstingsstjórnuð
Rafkveikja				
	Bensín (E10)	l/MJ	0,0756	0,0803

			Innsog	Þrýstingsstjórnuð
		gCO_2/MJ	174	184
	CNG (G20)	m^3/MJ	0,0719	0,0764
		gCO_2/MJ	129	137
	Fljótandi jarðolíugas (LPG)	l/MJ	0,0950	0,101
		gCO_2/MJ	155	164
	E85	l/MJ	0,102	0,108
		gCO_2/MJ	169	179
Þjöppukveikja				
	Dísilolía (B7)	l/MJ	0,0611	0,0611
		gCO_2/MJ	161	161

6. undirviðauki – 3. viðbætir

Útreikningur á gasorkuhlutfalli fyrir loftkennt eldsneyti (fljótandi jarðolíugas og jarðgas/lífmetan)

1. Mæling á massa loftkennds eldsneytis sem er notað í prófunarlotu prófunar 1

   Mæling á massa gass sem er notað í prófunarlotunni skal gerð með vigtunarkerfi fyrir eldsneyti sem getur mælt þyngd geymsluílátsins við prófunina í samræmi við eftirfarandi:

   a) Munurinn á milli mælingar við upphaf og við lok prófunarinnar sýnir nákvæmni sem er ±2% eða betri.

   b) Gera skal varúðarráðstafanir til að koma í veg fyrir mælingarskekkjur.

      Slíkar varúðarráðstafanir skulu a.m.k. felast í því að sýna varkárni við uppsetningu búnaðarins í samræmi við leiðbeiningar frá framleiðanda mælitækisins og góðar verkfræðilegar starfsvenjur.

   c) Aðrar mæliaðferðir eru leyfðar ef hægt er að sýna fram á jafngilda nákvæmni.

2. Útreikningur á gasorkuhlutfalli

   Gildi eldsneytisnotkunar skal reiknað út frá losun vetniskolefna, kolsýrings og koltvísýrings sem er ákvörðuð út frá niðurstöðum mælinga að því gefnu að einungis loftkennt eldsneyti sé brennt við prófunina.

   Ákvarða skal gashlutfall orkunnar sem er notuð í prófunarlotunni með eftirfarandi jöfnu:

$$G_{gas} = \left(\frac{M_{gas} \times cf \times 10^4}{FC_{norm} \times dist \times \rho} \right)$$

   þar sem:

   G_{gas} er gasorkuhlutfallið, í %

   M_{gas} er massi loftkennds eldsneytis sem er notað í prófunarlotunni, í kg,

   FC_{norm} er eldsneytisnotkunin (í l/100 km fyrir fljótandi jarðolíugas, í m^3/100 km fyrir jarðgas/lífmetan) sem er reiknuð út í samræmi við liði 6.6 og 6.7 í 7. undirviðauka,

dist er vegalengdin sem skráð er í prófunarlotunni, í km,

ρ er eðlismassi gassins:

$\rho = 0{,}654$ kg/m^3 fyrir jarðgas/lífmetan,

$\rho = 0{,}538$ kg/lítra fyrir fljótandi jarðolíugas,

cf er leiðréttingarstuðullinn að eftirtöldum gildum gefnum:

cf = 1 ef um er að ræða jarðolíugas eða viðmiðunareldsneyti G20,

cf = 0,78 ef um er að ræða viðmiðunareldsneyti G25.“

32) Í stað 6. undirviðauka a kemur eftirfarandi:

„Undirviðauki 6a

Prófun með leiðréttingu á umhverfishita til að ákvarða koltvísýringslosun við dæmigerð svæðisbundin skilyrði

1. Inngangur

Í þessum undirviðauka er lýst viðbótarprófunaraðferð með leiðréttingu á umhverfishita (ATCT) til að ákvarða koltvísýringslosun við dæmigerð svæðisbundin skilyrði.

1.1. Leiðrétta skal koltvísýringslosun frá ökutækjum með brunahreyfil og tvinnrafökutækjum, sem eru ekki ætluð fyrir ytri hleðslu, og gildi fyrir tvinnrafökutæki, sem ætluð eru fyrir ytri hleðslu, í hleðsluham, í samræmi við kröfurnar í þessum undirviðauka. Ekki er þörf á leiðréttingu fyrir koltvísýringsgildi afhleðsluprófunar. Ekki er þörf á leiðréttingu fyrir rafdrægni.

2. Prófunarhópur með leiðréttingu á umhverfishita (ATCT)

2.1. Einungis er heimilt að ökutæki sem eru eins að því er varðar alla eftirfarandi eiginleika séu hluti af sama ATCT-hópi:

a) Uppbyggingu aflrásar (þ.e. brunahreyfill, blendingshreyfill, efnarafali eða rafmagnshreyfill),

b) brunaferli (þ.e. tvígengis eða fjórgengis),

c) fjöldi og fyrirkomulag strokka,

d) aðferð við bruna í hreyfli (þ.e. óbein eða bein innsprautun),

e) gerð kælikerfis (þ.e. loft, vatn eða olía),

f) loftinntaksaðferð (þ.e. innsog eða þrýstingsstjórnun),

g) eldsneyti sem hreyfillinn er gerður fyrir (þ.e. bensín, dísilolía, jarðgas, fljótandi jarðolíugas, o.s.frv.),

h) hvarfakútur (þ.e. þrívirkur, NO_x-gildra fyrir veika blöndu, valvís hvötuð afoxun, NO_x-hvati fyrir veika blöndu eða annað),

i) hvort agnasía sé uppsett eða ekki og

j) útblásturshringrás (með eða án, kæld eða án kælingar).

Að auki skulu ökutækin vera svipuð að því er varðar eftirfarandi eiginleika:

k) munurinn á sprengirými hreyfla ökutækjanna skal ekki vera meiri en sem nemur 30% þess ökutækis sem hefur lægsta sprengirýmið og

l) einangrun vélarrýmis skal vera af samskonar gerð að því er varðar efni, magn og staðsetningu einangrunarinnar. Framleiðendur skulu sýna viðurkenningaryfirvaldinu fram á (t.d. með CAD-tölvuteikningum) að umfang og þyngd einangrunarefnisins sem er sett í öll ökutæki hópsins sé meira en 90% af því sem notað er í ATCT-mælda viðmiðunarökutækinu.

Einnig er heimilt að líta svo á að munur á efni og staðsetningu einangrunarefnis sé hluti af einum ATCT-hópi að uppfylltum því skilyrði að hægt sé að sýna fram á að prófunarökutækið sé versti kosturinn að því er varðar einangrun vélarrýmis.

2.1.1. Ef virkur varmageymslubúnaður hefur verið settur upp skulu aðeins ökutæki sem uppfylla eftirfarandi kröfur teljast vera hluti af sama ATCT-hópnum:

i. Varmarýmdin, sem skilgreind er af varmanum sem geymdur er í kerfinu, er á bilinu 0–10% ofar en vermir prófunarökutækisins og

ii. framleiðandi upprunalegs búnaðar geti fært tækniþjónustunni sannanir fyrir því að tími hitalosunar við ræsingu hreyfils innan hóps sé innan vikmarka sem eru 0-10% undir tíma hitalosunar í prófunarökutæki.

2.1.2. Aðeins ökutæki sem uppfylla viðmiðanir sem settar eru fram í lið 3.9.4 í þessum 6. undirviðauka a skulu teljast hluti sama ATCT-hópsins.

3. Tilhögun ATCT-prófunar

Prófun 1 sem tilgreind er í 6. undirviðauka skal framkvæmd að undanskildum kröfunum sem tilgreindar eru í liðum 3.1 til 3.9 í þessum 6. undirviðauka a. Þetta krefst einnig nýs útreiknings og beitingar gírskiptingarpunkta í samræmi við 2. undirviðauka að teknu tilliti til mismunandi ökumótstöðu eins og tilgreint er í lið 3.4 í þessum 6. undirviðauka a.

3.1. Umhverfisskilyrði fyrir ATCT-prófun

3.1.1. Það hitastig (T_{reg}) sem nota skal til að láta ökutækið ná varmajafnvægi við og framkvæma ATCT-prófunina við skal vera 14 °C.

3.1.2. Lágmarkstími til að koma á varmajafnvægi (t_{soak_ATCT}) fyrir ATCT-prófun skal vera 9 klst.

3.2. Prófunarklefi og varmajafnvægissvæði

3.2.1. Prófunarklefi

3.2.1.1. Prófunarklefinn skal hafa hitastig stillipunkts sem jafngildir T_{reg}. Gildi raunhitastigs skal vera innan ±3 °C við upphaf prófunarinnar og innan ±5 °C meðan á prófuninni stendur.

3.2.1.2. Sértækur raki (H) í annaðhvort loftinu í prófunarklefanum eða inntaksloftinu í hreyflinum skal vera:

$3{,}0 \leq H \leq 8{,}1$ (g H_2O/kg af þurru lofti)

3.2.1.3. Mæla skal lofthita og raka við úttak kæliviftunnar á 0,1 Hz tíðni.

3.2.2. Varmajafnvægissvæði

3.2.2.1. Hitastig stillipunkts á varmajafnvægissvæðinu skal jafngilda T_{reg} og gildi raunhitastigs skal vera innan ±3 °C á fimm mínútna hlaupandi meðalgildi og má ekki sýna kerfisbundið frávik frá stillipunktinum. Hitastig skal stöðugt mælt á 0,033 Hz lágmarkstíðni.

3.2.2.2. Staðsetning hitaskynjarans fyrir varmajafnvægissvæði skal vera dæmigerð til að mæla umhverfishitann í kringum ökutækið og skal tækniþjónustan athuga hana.

Skynjarinn skal vera a.m.k. 10 cm frá vegg varmajafnvægissvæðisins og vera varinn gegn beinu lofstreymi.

Loftstreymisskilyrði innan varmajafnvægissvæðisins í nágrenni við ökutækið skulu endurspegla eðlilegt varmastreymi sem dæmigert er fyrir stærð herbergisins (ekkert þvingað varmastreymi).

3.3. Prófunarökutæki

3.3.1. Ökutækið sem prófað er skal vera dæmigert fyrir hópinn sem ATCT-gögnin eru ákvörðuð fyrir (eins og lýst er í lið 2.1 í þessum 6. undirviðauka a).

3.3.2. Úr ATCT-hópnum skal velja brúunarhópinn með lægsta slagrými hreyfils (sjá 2. lið í þessum 6. undirviðauka a) og prófunarökutækið skal vera í tilhöguninni „ökutæki H“ í þessum hópi.

3.3.3. Það ökutæki sem er með lægsta vermi í virka varmageymslubúnaðinum og hægustu varmalosun fyrir virka varmageymslubúnaðinn frá ATCT-hópnum skal valið, eftir atvikum.

3.3.4. Prófunarökutækið skal uppfylla kröfurnar sem kveðið er á um í lið 2.3 í 6. undirviðauka og lið 2.1 í þessum 6. undirviðauka a.

3.4. Stillingar

3.4.1. Ökumótstöðu- og aflmælisstillingar skulu vera eins og tilgreint er í 4. undirviðauka, þ.m.t. krafan um að stofuhiti skuli vera 23 C°.

Til að taka tillit til mismunar á eðlismassa lofts við 14 °C þegar hann er borinn saman við eðlismassa lofts við 20 °C skal vegkeflið stillt eins og tilgreint er í 7. og 8. lið 4. undirviðauka með þeirri undantekningu að f_{2_TReg} úr eftirfarandi jöfnu skal notað sem markgildi C_t.

$$f_{2\_TReg} = f_2 \times (T_{ref} + 273)/(T_{reg} + 273)$$

þar sem:

f_2 er annars stigs ökumótstöðustuðull, við viðmiðunarskilyrði, í $N/(km/klst.)^2$,

T_{ref} er viðmiðunarhitastig ökumótstöðu eins og tilgreint er í lið 3.2.10 í þessum viðauka, í C,

T_{reg} er svæðisbundið hitastig, eins og er skilgreint í lið 3.1.1, í C.

Ef gild stilling vegkeflis á 23 °C er möguleg skal annars stigs vegkeflisstuðullinn C_d aðlagaður í samræmi við eftirfarandi jöfnu:

$$C_{d\_Treg} = C_d + (f_{2\_TReg} - f_2)$$

3.4.2. Framkvæma skal ATCT-prófunina og stillingu á ökumótstöðu hennar á vegkefli fyrir tvíhjóladrif ef samsvarandi prófun 1 var framkvæmd á vegkefli fyrir tvíhjóladrif og þá skal framkvæma ATCT-prófunina og stillingu á ökumótstöðu hennar á vegkefli fyrir fjórhjóladrif ef samsvarandi prófun 1 var gerð á vegkefli fyrir fjórhjóladrif.

3.5. Formeðhöndlun

Óski framleiðandi þess má framkvæma formeðhöndlun við T_{reg}.

Hitastig hreyfilsins skal vera innan ±2 °C af stillipunkti við 23 °C eða vera T_{reg}, eftir því hvort hitastigið er valið fyrir formeðhöndlunina.

3.5.1. Hrein brunahreyfilsökutæki skulu formeðhöndluð eins og tilgreint er í lið 2.6 í 6. undirviðauka.

3.5.2. Tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu skulu formeðhöndluð eins og tilgreint er í lið 3.3.1.1 í 8. undirviðauka.

3.5.3. Tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu skulu formeðhöndluð eins og tilgreint er í lið 2.1.1 eða 2.1.2 í 4. viðbæti við 8. undirviðauka.

3.6. Aðferð til að koma á varmajafnvægi

3.6.1. Eftir formeðhöndlun og fyrir prófun skulu ökutækin geymd á varmajafnvægissvæði með þeim umhverfisskilyrðum sem lýst er í lið 3.2.2 í þessum 6. undirviðauka a.

3.6.2. Frá lokum formeðhöndlunar til varmajafnvægismeðhöndlunar við T_{reg} skal ökutækið ekki látið vera við annað hitastig en T_{reg} lengur en 10 mínútur.

3.6.3. Ökutækið skal síðan geymt á varmajafnvægissvæðinu þannig að tíminn frá lokum formeðhöndlunar-prófunarinnar til upphafs ATCT-prófunarinnar sé jafngildur t_{soak_ATCT} með vikmörkum allt að 15 mínútum til viðbótar. Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins má framlengja t_{soak_ATCT} um allt að 120 mínútur. Í slíku tilviki skal nota framlengda tímann fyrir kælinguna sem tilgreind er í lið 3.9 í þessum undirviðauka.

3.6.4. Varmajafnvægismeðhöndlunin skal framkvæmd án þess að notuð sé kælivifta og með alla hluta ökutækis staðsetta eins og gert er ráð fyrir við venjulega kyrrstöðu. Tíminn milli loka formeðhöndlunar og upphafs ATCT-prófs skal skráður.

3.6.5. Flutningurinn af varmajafnvægissvæðinu í prófunarklefann skal taka eins stuttan tíma og auðið er. Ökutækið skal ekki haft í öðru hitastigi en T_{reg} lengur en 10 mínútur.

3.7. ATCT-prófun

3.7.1. Prófunarlotan skal vera viðeigandi WLTC-prófunarlota eins og tilgreint er í 1. undirviðauka fyrir þann undirflokk ökutækja.

3.7.2. Fylgja skal verklagsreglum til að framkvæma losunarprófun eins og tilgreint er í 6. undirviðauka um hrein brunahreyfilsökutæki og í 8. undirviðauka um tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og um hleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu með þeirri undanþágu að umhverfisskilyrðin fyrir prófunarklefann skulu vera þau sem lýst er í lið 3.2.1 í þessum 6. undirviðauka a.

3.7.3. Einkum skal losun gegnum útblástursrör, sem skilgreind er í þrepi nr. 1 í töflu A7/1 fyrir hrein brunahreyfilsökutæki og í þrepi nr. 2 í töflu A8/5 fyrir tvinnrafökutæki við ATCT-prófun, ekki vera yfir Euro 6 losunarmörkum sem gilda um prófunarökutækið samkvæmt skilgreiningu í töflu 2 í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 715/2007.

3.8. Útreikningur og skjalahald

3.8.1. Leiðréttingarstuðull hóps, *FCF*, skal reiknaður út sem hér segir:

$$FCF = M_{CO2,Treg}/M_{CO2,23°}$$

þar sem

$M_{CO2,23°}$ er massalosun koltvísýrings fyrir meðaltal allra viðeigandi prófana 1 á ökutæki H við 23 °C, eftir þrep nr. 3 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka fyrir hrein brunahreyfilsökutæki og eftir þrep nr. 3 í töflu A8/5 fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, en án frekari leiðréttingar, í g/km,

$M_{CO2,Treg}$ er massalosun koltvísýrings í gegnum heila WLTC-lotu við svæðisbundið hitastig eftir þrep nr. 3 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka fyrir hrein brunahreyfilsökutæki og eftir þrep nr. 3 í töflu A8/5 fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, en án frekari leiðréttingar, í g/km. Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu skal nota K_{CO2} stuðulinn eins og hann er skilgreindur í 2. viðbæti 8. undirviðauka.

Mæla skal bæði $M_{CO2,23°}$ og $M_{CO2,Treg}$ á sama prófunarökutækinu.

Leiðréttingarstuðull hóps *FCF* skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

Leiðréttingarstuðull hóps *FCF* skal námundaður að fjórum aukastöfum.

3.8.2. Koltvísýringsgildi fyrir hvert hreint brunahreyfilsökutæki innan ATCT-hópsins (eins og skilgreint er í lið 2.3 í þessum 6. undirviðauka a) skulu reiknuð út með eftirfarandi jöfnum:

$$M_{CO2,c,5} = M_{CO2,c,4} \times FCF$$

$$M_{CO2,p,5} = M_{CO2,p,4} \times FCF$$

þar sem

$M_{CO2,c,4}$ og $M_{CO2,p,4}$ er massalosun koltvísýrings í gegnum heila WLTC-prófunarlotu, c, og lotufasa, p, sem leiðir af fyrra útreikningaþrepi, í g/km,

$M_{CO2,c,5}$ og $M_{CO2,p,5}$ er massalosun koltvísýrings í gegnum heila WLTC-lotu, c, og lotufasa, p, þ.m.t. ATCT-leiðréttingu og skal notað fyrir frekari leiðréttingar eða frekari útreikninga, í g/km.

3.8.3. Koltvísýringsgildi fyrir hvert tvinnrafökutæki ætlað fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki er ætlað fyrir ytri hleðslu innan ATCT-hópsins (eins og skilgreint er í lið 2.3 í þessum 6. undirviðauka a) skulu reiknuð út með eftirfarandi jöfnum:

$$M_{CO2,CS,c,5} = M_{CO2,CS,c,4} \times FCF$$

$$M_{CO2,CS,p,5} = M_{CO2,CS,p,4} \times FCF$$

þar sem

$M_{CO2,CS,c,4}$ og $M_{CO2,CS,p,4}$ er massalosun koltvísýrings í gegnum heila WLTC-prófunarlotu, c, og lotufasa, p, sem leiðir af fyrra útreikningaþrepi, í g/km,

$M_{CO2,CS,c,5}$ og $M_{CO2,CS,p,5}$ er massalosun koltvísýrings í gegnum heila WLTC-lotu, c, og lotufasa, p, þ.m.t. ATCT-leiðréttingu og skal notað fyrir frekari leiðréttingar eða frekari útreikninga, í g/km.

3.8.4. Ef leiðréttingarstuðull hóps *FCF* er minni en einn telst hann vera jafn einum við verstu hugsanlegu aðstæður í samræmi við lið 4.1 í þessum undirviðauka.

3.9. Ákvæði fyrir kælingu

3.9.1. Að því er varðar prófunarökutæki sem er viðmiðunarökutæki fyrir ATCT-hóp og öll ökutæki af gerðinni H í brúunarhópum innan ATCT-hópsins skal mæla lokahitastig kælivökva hreyfilsins eftir að hafa keyrt viðkomandi prófun 1 við 23 °C og síðan varmajafnvægismeðhöndlun við 23 °C á meðan t_{soak_ATCT} stendur, með vikmörk upp að 15 mínútum til viðbótar. Tímalengdin er mæld frá lokum þeirrar viðkomandi prófunar 1.

3.9.1.1. Ef t_{soak_ATCT} hefur verið framlengt í viðkomandi ATCT-prófun skal sami varmajafnvægistíminn notaður, með vikmörk upp á 15 mínútur til viðbótar.

3.9.2. Hefja skal kælingarferlið eins fljótt og auðið er þegar prófun 1 er lokið, með hámarkstöf upp á 20 mínútur. Mældur varmajafnvægistími er tíminn á milli mælingar á lokahitastigi og loka prófunar 1 við 23 °C og skal koma fram á öllum viðeigandi prófunarblöðum.

3.9.3. Meðalhiti varmajafnvægissvæðis síðustu 3 klukkustundirnar skal dregið frá mældu hitastigi kælivökva hreyfilsins við lok varmajafnvægistímans sem tilgreindur er í lið 3.9.1. Vísað er í þetta sem Δ_{T_ATCT}, sem er námundað að næstu heilu tölu.

3.9.4. Ef Δ_{T_ATCT} er hærra en eða jafnt og –2 °C úr Δ_{T_ATCT} gildi prófunarökutækisins skal þessi brúunarhópur teljast tilheyra sama ATCT-hópnum.

3.9.5. Mæla skal kælivökvann á sama stað í kælikerfinu í öllum ökutækjum innan ATCT-hóps. Sá staður skal vera eins nálægt hreyflinum og hægt er svo að hitastig kælivökvans sé eins dæmigert og hægt er fyrir hitastig hreyfilsins.

3.9.6. Mæling hitastigs á varmajafnvægissvæðum skal vera eins og tilgreint er í lið 3.2.2.2 í þessum 6. undirviðauka a.

4. Staðgöngukostir í ferli mælingar

4.1. Kæling ökutækis við verstu hugsanlegu aðstæður

Að beiðni framleiðanda og með samþykki viðurkenningaryfirvalds er heimilt að beita kælingaraðferð prófunar 1 í stað fyrir ákvæðin í lið 3.6 í þessum 6. undirviðauka a. Í því skyni:

a) Ákvæði liðar 2.7.2 í 6. undirviðauka skulu gilda ásamt viðbótarkröfum um að varmajöfnunartíminn vari í minnst 9 klukkustundir.

b) Hitastig hreyfilsins skal vera innan ±2 °C frá stillipunktinum T_{reg} áður en ATCT-prófun hefst. Það hitastig skal koma fram á öllum viðeigandi prófunarblöðum. Í þessu tilviki má sleppa ákvæðinu fyrir kælingu sem lýst er í lið 3.9 í þessum 6. undirviðauka a og viðmiðunum fyrir einangrun vélarrýmis hvað varðar öll ökutæki í hópnum.

Þessi staðgöngukostur er ekki leyfður ef ökutækið er búið virkum varmageymslubúnaði.

Beiting þeirrar nálgunar skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

4.2. ATCT-hópur sem samanstendur af einum brúnarhópi

Sleppa má ákvæðinu um kælingu sem lýst er í lið 3.9 í þessum 6. undirviðauka a ef ATCT-hópurinn hefur einungis einn brúnarhóp. Þetta skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.

4.3. Annars konar hitamæling hreyfils

Ef mæling á hitastigi kælivökva er ekki gerleg má, að beiðni framleiðanda og með samþykki viðurkenningaryfirvalds, nota hitastig á smurolíu í stað fyrir hitastig kælivökva vegna ákvæðisins um kælingu sem lýst er í lið 3.9 í þessum 6. undirviðauka a. Í því tilviki skal nota hitastig á smurolíu fyrir öll ökutæki í hópnum.

Beiting þeirrar aðferðar skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum.“

33) Eftirfarandi 6. undirviðauka b er bætt við:

„Undirviðauki 6b

Leiðrétting á niðurstöðum fyrir koltvísýring út frá markhraða og markvegalengd

1. Almennt

Í þessum 6. undirviðauka b er skilgreind lýsing á sértækum ákvæðum varðandi leiðréttingu á niðurstöðum úr prófun fyrir losun koltvísýrings út frá markhraða og markvegalengd.

Ákvæði þessa 6. undirviðauka b eiga einungis við um hrein brunahreyfilsökutæki.

2. Hraðamæling ökutækis

2.1. Taka skal sýni af raunverulegum/mældum hraða ökutækis (v_{mi}, í km/klst.) með mælingu á hraða keflisins í vegkeflinu með 10 Hz tíðni mælinga ásamt rauntímanum sem svarar til raunverulega hraðans.

2.2. Markhraðinn (v_i, í km/klst.) á milli tímapunkta í töflum A1/1 til A1/12 í 1. undirviðauka skal ákvarðaður með línulegri brúnaraðferð á tíðninni 10 Hz.

3. Leiðréttingarferli

3.1. Útreikningur á raunverulegu/mældu afli og markafli við hjólin

Reikna skal út afl og krafta við hjólin út frá markhraða og raunverulegum/mældum hraða með eftirfarandi jöfnum:

$$F_i = f_0 + f_1 \times \frac{(V_i + V_{i-1})}{2} + f_2 \times \frac{(V_i + V_{i-1})^2}{4} + (TM + m_r) \times a_i$$

$$P_i = F_i \times \frac{(V_i + V_{i-1})}{3{,}6 \times 2} \times 0{,}001$$

$$F_{mi} = f_0 + f_1 \times \frac{(Vm_i + Vm_{i-1})}{2} + f_2 \times \frac{(Vm_i + Vm_{i-1})^2}{4} + (TM + m_r) \times a_{mi}$$

$$P_{mi} = F_{mi} \times \frac{(Vm_i + Vm_{i-1})}{3{,}6 \times 2} \times 0{,}001$$

$$a_i = \frac{(V_i - V_{i-1})}{3{,}6 \times (t_i - t_{i-1})}$$

$$a_{mi} = \frac{(Vm_i - Vm_{i-1})}{3{,}6 \times (t_i - t_{i-1})}$$

þar sem:

F_i er markdrifkrafturinn meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í N,

F_{mi} er raunverulegur/mældur drifkraftur meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í N,

P_i er markaflið meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í kW,

P_{mi} er raunverulegt/mælt afl meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í kW,

f_0, f_1, f_2 eru ökumótstöðustuðlar úr 4. undirviðauka, N, N/(km/klst, N/(km/klst)^2,

V_i er markhraðinn á tímanum (i), í km/klst.,

Vm_i er raunverulegur/mældur hraði á tímanum (i), í km/klst,

TM er prófunarmassi ökutækis, í kg,

m_r er samsvarandi virkur massi snúningsíhluta í samræmi við lið 2.5.1 í 4. undirviðauka, í kg,

a_i er markhröðunin meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í m/s^2,

a_{mi} er raunveruleg/mæld hröðun meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í m/s^2,

t_i er tíminn, í s.

3.2. Upphaflegt $P_{OVERRUN,1}$ gildi er reiknað út í næsta þrepi með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{OVERRUN,1} = -0{,}02 \times P_{RATED}$$

þar sem:

$P_{OVERRUN,1}$ er upphaflegt umframafl, í kW,

P_{RATED} er nafnafl ökutækis, í kW.

3.3. Öll útreiknuð gildi P_i og P_{mi} sem eru lægri en $P_{OVERRUN,1}$ skulu stillt á $P_{OVERRUN,1}$ í því skyni að útiloka neikvæð gildi sem varða ekki koltvísýringslosun.

3.4. Reikna skal út $P_{m,j}$ gildin fyrir hvern einstakan fasa WLTC-prófunarlotunnar með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{m,j} = \sum_{t_0}^{t_{end}} P_{mi}/n$$

þar sem:

$P_{m,j}$ er meðaltal af raunafli/mældu afli í fasa j sem um ræðir, í kW,

P_{mi} er raunverulegt/mælt afl meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur, í kW,

t_0 er tíminn við upphaf viðkomandi fasa j, í s,

t_{end} er tíminn við lok viðkomandi fasa j, í s,

n er fjöldi tímaþrepa í viðkomandi fasa,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi fasa.

3.5. Meðaltal leiðréttingar á massalosun koltvísýrings (g/km) fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis (RCB) í hverjum fasa viðeigandi WLTC-prófunarlotu skal gefið upp í g/s einungum með eftirfarandi jöfnu:

$$M_{CO2,j} = M_{CO2,RCB,j} \times \frac{d_{m,j}}{t_j}$$

þar sem:

$M_{CO2,j}$ er meðalmassalosun koltvísýrings í fasa j, í g/s,

$M_{CO2,RCB,j}$ er massalosun koltvísýrings í þrepi nr. 1 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka í fasa j í WLTC-prófunarlotunni sem um ræðir, leiðrétt í samræmi við 2. viðbæti við 6. undirviðauka og með þeirri kröfu að leiðréttingu fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis (RCB) sé beitt án þess að taka tillit til leiðréttingarviðmiðunar c,

$d_{m,j}$ er sú fjarlægð sem er raunverulega ekin í viðkomandi fasa j, í km,

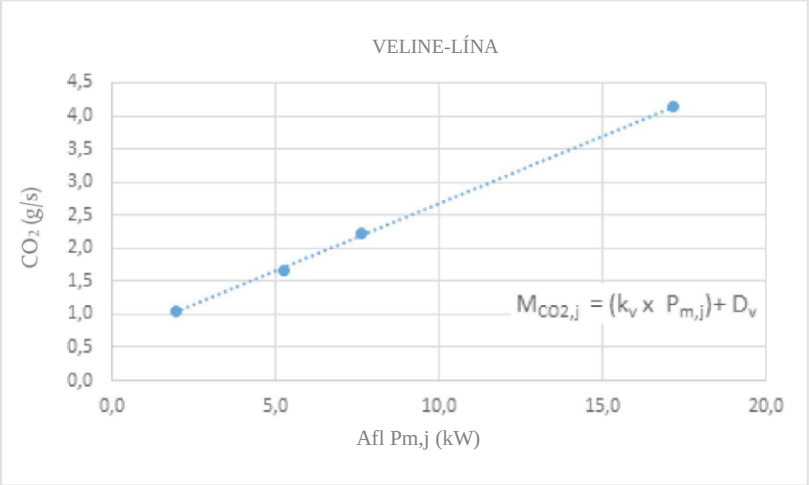
t_j er tímalengd viðkomandi fasa j, í s.

3.6. Í næsta þrepi skal, í hverjum fasa WLTC-prófunar, tengja þessa massalosun koltvísýrings (g/s) við meðalgildin $P_{m,j1}$ sem reiknuð eru út í samræmi við lið 3.4 í þessum 6. undirviðauka b.

Reikna skal út bestu aðlögun gagnanna með aðhvarfsaðferð minnstu fervika. Dæmi um þessa aðhvarfslínu (Veline-línu) er sýnt á mynd A6b/1.

Mynd A6b/1

Dæmi um Veline-aðhvarfslínu



3.7. Sérstök Veline-jafna 1 fyrir ökutæki sem er reiknuð út frá lið 3.6 í þessum 6. undirviðauka b er notuð til að skilgreina samsvörunina á milli koltvísýringslosunar í g/s í viðkomandi fasa j og meðaltalið af mældu afli við hjólin í sömu prófunarlotu j og er gefin upp með eftirfarandi jöfnu:

$$M_{CO2,j} = (k_{v,1} \times P_{m,j1}) + D_{v,1}$$

þar sem:

$M_{CO2,j}$ er meðalmassalosun koltvísýrings í fasa j, í g/s,

$P_{m,j1}$ er meðaltal af raunafli/mældu afli í viðkomandi fasa j og er reiknað út með $P_{OVERRUN,1}$, í kW,

$k_{v,1}$ er hallatalan í Veline-jöfnu 1, í g CO_2/kWs,

$D_{v,1}$ er fastinn í Veline-jöfnu 1, í g CO_2/s.

3.8. Næsta $P_{OVERRUN,2}$ gildi er reiknað út í næsta þrepi með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{OVERRUN,2} = - D_{v,1} / k_{v,1}$$

þar sem:

$P_{OVERRUN,2}$ er næsta umframafl, í kW

$k_{v,1}$ er hallatalan í Veline-jöfnu 1, í g CO_2/kWs,

$D_{v,1}$ er fastinn í Veline-jöfnu 1, í g CO_2/s.

3.9. Öll útreiknuð gildi P_i og P_{mi} í lið 3.1 í þessum 6. undirviðauka b sem eru lægri en $P_{OVERRUN,2}$ skulu stillt að $P_{OVERRUN,2}$ í því skyni að útiloka neikvæð gildi sem varða ekki koltvísýringslosun.

3.10. Endurreikna skal $P_{m,j2}$ gildin fyrir hvern einstakan fasa WLTC-prófunar með jöfnunum í lið 3.4 í þessum 6. undirviðauka b,

3.11. Reikna skal út nýja sérstaka Veline-jöfnu 2 fyrir ökutæki með aðhvarfsaðferð minnstu fervika sem lýst er í lið 3.6 í þessum 6. undirviðauka b. Veline-jafna 2 er gefin upp með eftirfarandi jöfnu:

$$M_{CO2,j} = (k_{v,2} \times P_{m,j2}) + D_{v,2}$$

þar sem:

$M_{CO2,j}$ er meðalmassalosun koltvísýrings í fasa j, í g/s,

$P_{m,j2}$ er meðaltal af raunafli/mældu afli í viðkomandi fasa j og er reiknað út með $P_{OVERRUN,2}$, í kW,

$k_{v,2}$ er hallatalan í Veline-jöfnu 2, í g CO_2/kWs,

$D_{v,2}$ er fastinn í Veline-jöfnu 2, í g CO_2/s.

3.12. Í næsta þrepinu skal reikna út $P_{i,j}$ gildin úr sniði markhraðans fyrir hvern einstakan fasa WLTC-prófunarlotunnar með eftirfarandi jöfnu:

$$P_{i,j2} = \sum_{t_0}^{t_{end}} P_{i,2}/n$$

þar sem:

$P_{i,j2}$ er meðaltal markafls í viðkomandi fasa j og er reiknað út með $P_{OVERRUN,2}$, í kW,

$P_{i,2}$ er markaflið meðan á tímabilinu frá (i – 1) til (i) stendur og er reiknað út með $P_{OVERRUN,2}$, í kW,

t_0 er tíminn við upphaf viðkomandi fasa j, í s,

t_{end} er tíminn við lok viðkomandi fasa j, í s,

n er fjöldi tímaþrepa í viðkomandi fasa,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi fasa WLTC-prófunarlotunnar.

3.13. Delta fyrir massalosun koltvísýrings á tímabili j sett fram í g/s er síðan reiknaður út með eftirfarandi jöfnu:

$$\Delta CO_{2,j} = k_{v,2} \times (P_{i,j2} - P_{m,j2})$$

þar sem:

$\Delta CO_{2,j}$ er Delta fyrir massalosun koltvísýrings á tímabili j, sett fram í g/s,

$k_{v,2}$ er hallatalan í Veline-jöfnu 2, í g CO_2/kWs,

$P_{i,j2}$ er meðaltal markafls á viðkomandi tímabili j g er reiknað út með $P_{OVERRUN,2}$, í kW,

$P_{m,j2}$ er meðaltal af raunafli/mældu afli á viðkomandi tímabili j og er reiknað út með $P_{OVERRUN,2}$, í kW,

j er viðkomandi tímabil j og það getur verið lotufasi eða heildarlota.

3.14. Endanleg massalosun koltvísýrings leiðrétt fyrir vegalengd og hraða er reiknuð út með eftirfarandi jöfnu:

$$M_{CO2,j,2b} = \left(\Delta CO_{2,j} + M_{CO2,j,1} \times \frac{d_{m,j}}{t_j}\right) \times t_j/d_{i,j}$$

þar sem:

$M_{CO2,j,2,b}$ er massalosun koltvísýrings leiðrétt fyrir vegalengd og hraða á tímabilinu j, í g/km,

$M_{CO2,j,1}$ er massalosun koltvísýrings á tímabili j í þrepi nr. 1, sjá töflu A7/1 í 7. undirviðauka, í g/km,

$\Delta CO_{2,j}$ er Delta fyrir massalosun koltvísýrings á tímabili j, sett fram í g/s,

t_j er lengd viðkomandi tímabils j, í s,

$d_{m,j}$ er sú fjarlægð sem er raunverulega ekin í viðkomandi fasa j, í km,

$d_{i,j}$ er markvegalengdin á viðkomandi tímabili j, í km,

j er viðkomandi tímabil j sem getur verið annaðhvort lotufasi eða heildarlota.“

34) Ákvæðum 7. undirviðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað annarrar málsgreinar liðar 1.1 kemur eftirfarandi:

„Í 4. lið í 8. undirviðauka er gefið þrepskipt ferli fyrir útreikning á niðurstöðum úr prófun.

b) Í stað fyrstu málsgreinar í lið 1.4 kemur eftirfarandi:

„Þrepskipt aðferð fyrir útreikning á lokaniðurstöðum úr prófun á ökutækjum knúnum brunahreyflum“.

c) Í stað töflu A7/1 í lið 1.4 kemur eftirfarandi:

„*Tafla A7/1*

Aðferð við að reikna út lokaniðurstöður úr prófun

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
6. undirviðauki	Óunnar niðurstöður úr prófun	Massalosun Liður 3. til 3.2.2 í þessum undirviðauka	$M_{i,p,1}$, í g/km, $M_{CO2,p,1}$, í g/km.	1
Frálagsþrep 1	$M_{i,p,1}$, í g/km, $M_{CO2,p,1}$, í g/km.	Útreikningur á sameinuðum lotugildum: $M_{i,c,2} = \frac{\sum_p M_{i,p,1} \times d_p}{\sum_p d_p}$ $M_{CO2,c,2} = \frac{\sum_p M_{CO2,p,1} \times d_p}{\sum_p d_p}$ þar sem: $M_{i/CO2,c,2}$ eru losunarniðurstöður fyrir heildarlotuna, d_p er sú vegalengd sem ekin er í lotufösunum, p.	$M_{i,c,2}$, í g/km, $M_{CO2,c,2}$, í g/km.	2
Frálagsþrep 1 og 2	$M_{CO2,p,1}$, í g/km, $M_{CO2,c,2}$, í g/km.	Leiðrétting á niðurstöðum fyrir koltvísýring út frá markhraða og markvegalengd 6. undirviðauki b. Athugasemd: Þar sem vegalengdin er einnig leiðrétt skal túlka allar tilvísanir í eknar vegalengdir sem tilvísanir í markvegalengdir frá og með þessu útreikningsþrepi.	$M_{CO2,p,2b}$, í g/km, $M_{CO2,c,2b}$, í g/km.	2b
Frálagsþrep 2b	$M_{CO2,p,2b}$, í g/km, $M_{CO2,c,2b}$, í g/km.	Leiðrétting fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslu-kerfis (RCB) 6. undirviðauki – 2. viðbætir	$M_{CO2,p,3}$, í g/km, $M_{CO2,c,3}$, í g/km.	3

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 2 og 3	$M_{i,c,2}$, í g/km, $M_{CO2,c,3}$, í g/km.	Aðferð við losunarprófun fyrir öll ökutæki sem búin eru kerfum sem endurnýja sig reglubundið, K_i. 6. undirviðauki – 1. viðbætir $M_{i,c,4} = K_i \times M_{i,c,2}$ eða $M_{i,c,4} = K_i + M_{i,c,2}$ og $M_{CO2,c,4} = K_{CO2} \times M_{CO2,c,3}$ eða $M_{CO2,c,4} = K_{CO2} + M_{CO2,c,3}$ Viðbótarjöfnun eða margfaldandi stuðull sem nota skal í samræmi við K_i ákvörðun. Ef K_i á ekki við: $M_{i,c,4} = M_{i,c,2}$ $M_{CO2,c,4} = M_{CO2,c,3}$	$M_{i,c,4}$, í g/km, $M_{CO2,c,4}$, í g/km.	4a
Frálagsþrep 3 og 4a	$M_{CO2,p,3}$, í g/km, $M_{CO2,c,3}$, í g/km, $M_{CO2,c,4}$, í g/km.	ef K_i á við skal samræma fasagildi koltvísýrings að sameinuðu lotugildi: $M_{CO2,p,4} = M_{CO2,p,3} \times AF_{Ki}$ fyrir hvern lotufasa p, þar sem: $AF_{Ki} = \frac{M_{CO2,c,4}}{M_{CO2,c,3}}$ Ef K_i á ekki við: $M_{CO2,p,4} = M_{CO2,p,3}$	$M_{CO2,p,4}$, í g/km.	4b
Frálagsþrep 4	$M_{i,c,4}$, í g/km, $M_{CO2,c,4}$, í g/km, $M_{CO2,p,4}$, í g/km.	ATCT-leiðrétting í samræmi lið 3.8.2 í 6. undirviðauka a. Spillistuðlar reiknaðir í samræmi við VII. viðauka og beitt á markgilda-losunargildin.	$M_{i,c,5}$, í g/km, $M_{CO2,c,5}$, í g/km, $M_{CO2,p,5}$, í g/km.	5 Niðurstaða úr stakri prófun.
Frálagsþrep 5	Fyrir hverja prófun: $M_{i,c,5}$, í g/km, $M_{CO2,c,5}$, í g/km, $M_{CO2,p,5}$, í g/km.	Meðaltal prófana og uppgefið gildi. Liðir 1.2 til 1.2.3 í 6. undirviðauka.	$M_{i,c,6}$, í g/km, $M_{CO2,c,6}$, í g/km, $M_{CO2,p,6}$, í g/km. $M_{CO2,c,declared}$, í g/km.	6
Frálagsþrep 6	$M_{CO2,c,6}$, í g/km, $M_{CO2,p,6}$, í g/km. $M_{CO2,c,declared}$, í g/km.	Samræming fasagilda. Liður 1.2.4 í 6. undirviðauka. og: $M_{CO2,c,7} = M_{CO2,c,declared}$	$M_{CO2,c,7}$, í g/km, $M_{CO2,p,7}$, í g/km.	7

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 6 og 7	$M_{i,c,6}$, í g/km, $M_{CO2,c,7}$, í g/km, $M_{CO2,p,7}$, í g/km.	Útreikningur á eldsneytisnotkun. 6. liður í þessum undirviðauka. Reikna skal eldsneytisnotkun fyrir viðeigandi lotu og fasa hennar sitt í hvoru lagi. Í því skyni: a) skal nota viðeigandi koltvísýringsgildi fyrir fasa eða lotu, b) skal nota markgildalosun fyrir alla lotuna. og: $M_{i,c,8} = M_{i,c,6}$ $M_{CO2,c,8} = M_{CO2,c,7}$ $M_{CO2,p,8} = M_{CO2,p,7}$	$FC_{c,8}$, í l/100 km, $FC_{p,8}$, í l/100 km, $M_{i,c,8}$, í g/km, $M_{CO2,c,8}$, í g/km, $M_{CO2,p,8}$, í g/km.	8 Niðurstaða prófunar 1 fyrir prófunarökutæki
8. þrep	Fyrir hvort prófunarökutæki H og L: $M_{i,c,8}$, í g/km, $M_{CO2,c,8}$, í g/km, $M_{CO2,p,8}$, í g/km, $FC_{c,8}$, í l/100 km, $FC_{p,8}$, í l/100 km.	Ef prófunarökutæki L er prófað til viðbótar við prófunarökutæki H skal markgildalosunargildið sem hlýst þar af vera hærra gildið af þessum tveimur og nefnt $M_{i,c}$. Nota á hæsta gildið af þeirri summu sem vísar til annaðhvort hálosandi ökutækis (VH) eða láglosandi ökutækis (VL) ef um er að ræða samþætta losun á vetniskolefnum + köfnunarefnisoxíði. Að öðrum kosti er $M_{i,c} = M_{i,c,8}$ ef ekkert ökutæki L var prófað Að því er varðar koltvísýring og FC-gildi skal nota gildin sem fengin voru í þrepi 8 og koltvísýringsgildi skulu námunduð að tveimur aukastöfum og FC-gildi að þremur aukastöfum.	$M_{i,c}$, í g/km, $M_{CO2,c,H}$, í g/km, $M_{CO2,p,H}$, í g/km, $FC_{c,H}$, í l/100 km, $FC_{p,H}$, í l/100 km, og ef ökutæki L var prófað: $M_{CO2,c,L}$, í g/km, $M_{CO2,p,L}$, í g/km, $FC_{c,L}$, í l/100 km, $FC_{p,L}$, í l/100 km.	9 Niðurstaða brúunarhóps. Endanlegar niðurstöður markgildalosunar.
9. þrep	$M_{CO2,c,H}$, í g/km, $M_{CO2,p,H}$, í g/km, $FC_{c,H}$, í l/100 km, $FC_{p,H}$, í l/100 km, og ef ökutæki L var prófað: $M_{CO2,c,L}$, í g/km, $M_{CO2,p,L}$, í g/km, $FC_{c,L}$, í l/100 km, $FC_{p,L}$, í l/100 km.	Eldsneytisnotkun og útreikningur á koltvísýringi fyrir einstök ökutæki í brúunarhópi. Samkvæmt lið 3.2.3 í þessum undirviðauka. Koltvísýringslosun skal gefin upp í grömmum á kílómetra (g/km) námundað að næstu heilu tölu, FC-gildi skulu gefin námunduð að einum aukastaf, gefið upp sem (l/100 km).	$M_{CO2,c,ind}$ í g/km, $M_{CO2,p,ind}$, í g/km, $FC_{c,ind}$ í l/100 km, $FC_{p,ind}$, í l/100 km.	10 Niðurstaða fyrir stakt ökutæki. Endanlegar niðurstöður koltvísýrings og FC.“

d) Í lið 2.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Rúmmálsstreymi skal mælt samfellt. Heildarrúmmál skal mælt meðan á prófuninni stendur.“

e) Liður 2.1.1 fellur brott.

f) Textanum í lið 3.2.1.1.3.1:

„Rf_{CH4} er svörunarstuðull logajónunarnema fyrir metan samkvæmt skilgreiningu í lið 5.4.3.2 í 5. undirviðauka.“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„Rf_{CH4} er svörunarstuðull logajónunarnema fyrir metan eins og er ákvarðað og tilgreint í lið 5.4.3.2 í 5. undirviðauka.“

g) Í stað liðar 3.2.1.1.3.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.1.1.3.2. Að því er varðar mælingar á metani með metanskilju ásamt logajónunarnema veltur útreikningur á vetniskolefnum, öðrum en metani, á því kvörðunargasi eða -aðferð sem var beitt við núllstillingu eða kvörðunarstillingu.

Logajónunarnemi sem er notaður (án metanskilju) til að mæla heildarmagn vetniskolefna skal kvarðaður með própani/lofti á venjulegan hátt.

Við kvörðun á logajónunarnemanum sem er raðtengdur við metanskilju eru eftirfarandi aðferðir heimilar:

a) Kvörðunargas sem samanstendur af própani/lofti fer fram hjá metanskiljunni,

b) kvörðunargas sem samanstendur af metani/lofti fer í gegnum metanskiljuna.

Eindregið er mælt með að kvarða metan-logajónunarnemann með metan- og loftblöndu í gegnum metanskiljuna.

Í aðferð a) skal reikna styrk metans og vetniskolefna, annarra en metans, með eftirfarandi jöfnum:

$$C_{CH4} = \frac{C_{HC(w/NMC)} - C_{HC(w/oNMC)} \times (1 - E_E)}{R_{fCH4} \times (E_E - E_M)}$$

$$C_{NMHC} = \frac{C_{HC(w/oNMC)} \times (1 - E_M) - C_{HC(w/NMC)}}{E_E - E_M}$$

Ef $R_{fCH4} < 1{,}05$, má sleppa því úr jöfnunni hér að ofan fyrir C_{H4}.

Í aðferð b) skal reikna styrk metans og vetniskolefna, annarra en metans, með eftirfarandi jöfnum:

$$C_{CH4} = \frac{C_{HC(w/NMC)} \times R_{fCH4} \times (1 - E_M) - C_{HC(w/oNMC)} \times (1 - E_E)}{R_{fCH4} \times (E_E - E_M)}$$

$$C_{NMHC} = \frac{C_{HC(w/oNMC)} \times (1 - E_M) - C_{HC(w/NMC)} \times R_{fCH4} \times (1 - E_M)}{E_E - E_M}$$

þar sem:

$C_{HC(w/NMC)}$ er styrkur vetniskolefna ásamt sýnatökulofti sem streymir um metanskiljuna, í milljónarhlutum C,

$C_{HC(w/oNMC)}$ er styrkur vetniskolefna ásamt sýnatökulofti sem fer fram hjá metanskiljunni, í milljónarhlutum C,

R_{fCH4} er svörunarstuðull fyrir metan eins og ákvarðað er samkvæmt lið 5.4.3.2 í 5. undirviðauka,

E_M er metanvirkni eins og ákvarðað er samkvæmt lið 3.2.1.1.3.3.1 í þessum undirviðauka,

E_E er etanvirkni eins og ákvarðað er samkvæmt lið 3.2.1.1.3.3.2 í þessum undirviðauka.

Ef $R_{fCH4} < 1{,}05$, má sleppa því úr jöfnunum fyrir aðferð b) hér á undan fyrir C_{CH4} og C_{NMHC}.“

h) Í stað annarrar málsgreinar í lið 3.2.1.1.3.4 kemur eftirfarandi:

„Jafnan til að reikna út C_{CH4} í lið 3.2.1.1.3.2 (aðferð b)) í þessum undirviðauka verður:“

i) Í stað liðar 3.2.3.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.3.1. Eldsneytisnotkun og koltvísýringslosun án þess að nota brúunaraðferðina (þ.e. einungis með ökutæki H)

Úthluta skal koltvísýringsgildum, eins og þau eru reiknuð út í liðum 3.2.1 til 3.2.1.1.2 í þessum undirviðauka, og eldsneytisnotkun, eins og hún er reiknuð út í samræmi við 6. lið í þessum undirviðauka, til allra einstakra ökutækja í brúunarhópnum og brúunaraðferðin skal ekki gilda.“

j) Í stað liðar 3.2.3.2.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.3.2.2. Útreikningur á ökumótstöðu fyrir einstakt ökutæki

Einungis skal gera útreikning á einstakri ökumótstöðu innan ökumótstöðuhóps sem er viðeigandi fyrir það einstaka ökutæki ef brúunarhópurinn er fenginn úr einum eða fleiri ökumótstöðuhópum.“

k) Í stað liðar 3.2.3.2.2.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.3.2.2.2. Snúningsmótstaða einstaks ökutækis“.

l) Eftirfarandi liðir 3.2.3.2.2.2.1, 3.2.3.2.2.2.2 og 3.2.3.2.2.2.3 bætast við:

„3.2.3.2.2.2.1. Nota skal raungildi veltiviðnámsstuðla (RRC) fyrir valda hjólbarða á prófunarökutækjum L, RR_L, og prófunarökutæki H, RR_H, sem ílag fyrir brúunaraðferðina. Sjá lið 4.2.2.1 í 4. undirviðauka.

Ef hjólbarðarnir á fram- og afturásum ökutækis L eða H hafa mismunandi gildi veltiviðnámsstuðla skal reikna út vegið meðalgildi snúningsmótstöðu með jöfnunni í lið 3.2.3.2.2.2.3 í þessum undirviðauka.

3.2.3.2.2.2.2. Fyrir hjólbarða sem settir eru undir einstök ökutæki skal gildi veltiviðnámsstuðuls RR_{ind} stillt á gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka.

Í tilvikum þar sem hægt er að afhenda einstök ökutæki með heilu setti af venjulegum hjólum og hjólbörðum ásamt heilu setti af snjóhjólbörðum (með 3PMS-merkingu – fjall með þremur toppum og snjókorni (e. *3 Peaked Mountain and Snowflake*)) með eða án hjóla skulu viðbótarhjólin/-hjólbarðarnir ekki teljast sem valfrjáls búnaður.

Ef hjólbarðarnir á fram- og afturásum tilheyra mismunandi orkunýtniflokkum skal nota vegið meðaltal og reikna það út með jöfnunni í lið 3.2.3.2.2.2.3 í þessum undirviðauka.

Ef sömu hjólbörðunum eða hjólbörðum með sama veltiviðnámsstuðlinum var komið fyrir á prófunarökutækjum L og H skal gildið fyrir RR_{ind} stillt á RR_H þegar brúunaraðferðin er notuð.

3.2.3.2.2.2.3. Vegið meðaltal snúningsmótstöðu reiknað út

$$RR_x = (RR_{x,FA} \times mp_{x,FA}) + (RR_{x,RA} \times (1 - mp_{x,FA}))$$

þar sem:

x	táknar ökutæki L, H eða einstakt ökutæki.
$RR_{L,FA}$ og $RR_{H,FA}$	eru raungildi veltiviðnámsstuðla fyrir hjólbarða á framásum ökutækja L og H, í þeirri röð, í kg/tonn,
$RR_{ind,FA}$	er gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka fyrir hjólbarða á framásum einstakra ökutækja, í kg/tonn,
$RR_{L,RA}$, og $RR_{H,RA}$	eru raungildi veltiviðnámsstuðla fyrir hjólbarða á afturásum ökutækja L og H, í þeirri röð, í kg/tonn,

$RR_{ind,RA}$ er gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka fyrir hjólbarða á afturásum einstakra ökutækja, í kg/tonn,

$mp_{x,FA}$ er hlutfall massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás,

ekki skal námunda eða flokka RRx gildi að orkunýtniflokkum hjólbarða.“

m) Í stað liðar 3.2.3.2.2.3 kemur eftirfarandi:

„3.2.3.2.2.3. Loftnúningsviðnám einstaks ökutækis“.

n) Eftirfarandi liðir 3.2.3.2.2.3.1 til 3.2.3.2.2.3.6 bætast við:

„3.2.3.2.2.3.1. Ákvörðun loftaflfræðilegra áhrifa á valfrjálsan búnað

Loftnúningsviðnám skal mælt fyrir hverja gerð af valfrjálsum búnaði og lögun yfirbyggingar sem hafa loftaflfræðileg áhrif á loftviðnámið, í vindgöngum sem uppfylla kröfurnar í lið 3.2 í 4. undirviðauka og hafa verið sannprófuð af viðurkenningaryfirvaldinu.

3.2.3.2.2.3.2. Staðgönguaðferð við ákvörðun loftaflfræðilegra áhrifa á valfrjálsan búnað

Að beiðni framleiðandans og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins er heimilt að nota staðgönguaðferð (þ.e. hermun, vindgöng sem ekki uppfylla viðmiðanirnar í 4. undirviðauka) til að ákvarða $\Delta(C_D \times A_f)$ að uppfylltum eftirtöldum skilyrðum:

a) Staðgönguaðferðin skal uppfylla nákvæmni fyrir $\Delta(C_D \times A_f)$ sem nemur ±0,015 m^2 og auk þess, ef notuð er hermun, ætti að fullgilda í smáatriðum aðferðina til straumfræðiútreikninga svo að raunveruleg loftstreymimunstur í kringum yfirbygginguna, þ.m.t. umfang straumhraða, kraftar eða þrýstingur, eru sýnd til að uppfylla fullgildingarniðurstöður úr prófun,

b) staðgönguaðferðin skal aðeins notuð fyrir þá hluta sem hafa áhrif á loftviðnámið (t.d. hjólasamstæðu, lögun yfirbyggingar, kælikerfi) sem jafngildið var sýnt fyrir,

c) sönnun á jafngildi skal sýnd viðurkenningaryfirvaldinu fyrir fram fyrir hvern ökumótstöðuhóp ef stærðfræðiaðferð er notuð, eða fjórða hvert ár ef notuð er mæliaðferð, og skulu byggjast í öllum tilvikum á vindgangamælingum sem uppfylla viðmiðanir þessa viðauka,

d) ef $\Delta(C_D \times A_f)$ fyrir tiltekinn valfrjálsan búnað er meira en tvöfalt en með þeim valfrjálsa búnaði sem sönnunin var gefin fyrir skal loftnúningsviðnámið ekki ákvarðað með staðgönguaðferð og

e) ef hermunarlíkani er breytt er nauðsynlegt að framkvæma endurfullgildingu.

3.2.3.2.2.3.3. Beiting loftaflfræðilegra áhrifa á einstakt ökutæki

$\Delta(C_D \times A_f)_{ind}$ er mismunurinn milli margfeldis loftnúningsviðnámsstuðulsins og framhliðar einstaks ökutækis samanborið við prófunarökutæki L vegna valkosta og lögunar yfirbyggingar ökutækisins sem eru frábrugðin prófunarökutæki L, í m^2,

Þessi munur á loftnúningsviðnámi, $\Delta(C_D \times A_f)$, skal ákvarðaður með áreiðanleika upp á ±0,015 m^2.

Reikna má $\Delta(C_D \times A_f)_{ind}$ með eftirfarandi jöfnu um leið og áreiðanleika upp á ±0,015 m^2 er einnig viðhaldið að því er varðar samtölu hluta valfrjáls búnaðar og lögunar yfirbyggingar:

$$\Delta(C_D \times A_f)_{ind} = \sum_{i=1}^{n} \Delta (C_D \times A_f)_i$$

þar sem:

C_D er loftnúningsviðnámsstuðullinn,

A_f er framhlið ökutækisins, í m^2,

n er sá fjöldi valfrjáls búnaðar á ökutæki sem er ekki eins á einstöku ökutæki og prófunarökutæki L,

$\Delta(C_D \times A_f)_i$ er mismunurinn milli margfeldis loftnúningsviðnámsstuðulsins og framhliðarinnar vegna einstaks þáttar, i, á ökutækinu og er jákvæð fyrir valfrjálsan búnað sem eykur loftnúningsviðnám að því er varðar prófunarökutæki L og öfugt, í m^2.
Summan á öllum muni á $\Delta(C_D \times A_f)_i$ milli prófunarökutækja L og H skal samsvara $\Delta(C_D \times A_f)_{LH}$.

3.2.3.2.2.3.4. Skilgreining á heilu loftaflfræðilegu Delta á milli prófunarökutækja H og L

Heildarmunurinn á margfeldi loftnúningsviðnámsstuðulsins og framhliðarinnar milli prófunarökutækja L og H skal gefinn upp sem $\Delta(C_D \times A_f)_{LH}$ og skal hafður með í öllum viðeigandi prófunarskýrslum, í m^2.

3.2.3.2.2.3.5. Skráning loftaflfræðilegra áhrifa

Aukning eða minnkun á margfeldi loftnúningsviðnámsstuðulsins og framhliðarinnar gefin upp sem $\Delta(C_D \times A_f)$ fyrir allan valfrjálsan búnað og lögun yfirbyggingar í brúunarhópnum sem:

a) Hefur áhrif á loftnúningsviðnám ökutækisins og

b) á að vera hluti af brúuninni,

skal koma fram í öllum viðeigandi prófunarskýrslum, í m^2.

3.2.3.2.2.3.6. Viðbótarákvæði um loftaflfræðileg áhrif

Beita skal loftnúningsviðnámi ökutækis H á allan brúunarhópinn og $\Delta(C_D \times A_f)_{LH}$ skal stillt á núll ef:

a) Búnaðurinn í vindgöngunum getur ekki ákvarðað $\Delta(C_D \times A_f)$ af nákvæmni eða

b) það er enginn valfrjáls búnaður sem hefur áhrif á viðnám og veldur fráviki milli prófunarökutækja H og L, sem á að taka tillit til í brúunaraðferðinni.“

o) Í stað fyrirsagnar, fyrstu málsgreinar og fyrstu jöfnu í lið 3.2.3.2.2.4 kemur eftirfarandi:

„3.2.3.2.2.4. Útreikningur ökumótstöðustuðla fyrir einstök ökutæki

Vísað er til ökumótstöðustuðla f_0, f_1 og f_2 (eins og skilgreint er í 4. undirviðauka) fyrir prófunarökutæki H og L sem $f_{0,H}$, $f_{1,H}$ og $f_{2,H}$, og sem $f_{0,L}$, $f_{1,L}$ og $f_{2,L}$ eftir því sem við á. Aðlöguð ökumótstöðukúrfa fyrir prófunarökutæki L er skilgreind sem hér segir:

$F_L(v) = f^*_{0,L} + f_{1,H} \times v + f^*_{2,L} \times v^2$“;

p) Í lið 3.2.3.2.3 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Þessar þrjár samsetningar af ökumótstöðu geta verið afleiddar frá mismunandi ökumótstöðuhópum.“

q) Í stað síðustu málsgreinar í lið 3.2.3.2.4 kemur eftirfarandi:

„Reikna skal út skilyrðin $E_{1,p}$, $E_{2,p}$ og $E_{3,p}$ og E_1, E_2 og E_3, eftir því sem við á, eins og skilgreint er í lið 3.2.3.2.3 í þessum undirviðauka.“

r) Í stað síðustu málsgreinar í lið 3.2.3.2.5 kemur eftirfarandi:

„Reikna skal út skilyrðin $E_{1,p}$, $E_{2,p}$ og $E_{3,p}$ og E_1, E_2 og E_3, eftir því sem við á, eins og skilgreint er í lið 3.2.3.2.3 í þessum undirviðauka.“

s) Eftirfarandi liður 3.2.3.2.6 bætist við:

„3.2.3.2.6. Framleiðandi upprunalegs búnaðar má hækka einstaka koltvísýringsgildið sem er ákvarðað í samræmi við lið 3.2.3.2.4 í þessum undirviðauka. Í slíkum tilvikum:

a) Skal hækka koltvísýringsgildi í fasa út frá hlutfalli hækkaða koltvísýringsgildisins deilt með útreiknaða koltvísýringsgildinu,

b) skal hækka gildi fyrir eldsneytisnotkun út frá hlutfalli hækkaða koltvísýringsgildisins deilt með útreiknaða koltvísýringsgildinu.

Þetta skal ekki bæta upp fyrir tæknilega þætti sem í reynd myndu leiða til þess að útiloka þyrfti ökutækið frá brúunarhópnum.“

t) Í stað liðar 3.2.4.1.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.4.1.1.2. Snúningsmótstaða einstaks ökutækis“.

u) Eftirfarandi liðir 3.2.4.1.1.2.1 til 3.2.4.1.1.2.3 bætast við:

„3.2.4.1.1.2.1. Gildi veltiviðnámsstuðla fyrir ökutæki L_M, RR_{LM}, og ökutæki H_M, RR_{HM}, sem valin eru samkvæmt lið 4.2.1.4 í 4. undirviðauka skulu liggja til grundvallar.

Ef hjólbarðarnir á fram- og afturásum ökutækja L_M eða H_M hafa mismunandi gildi veltiviðnámsstuðla skal reikna út vegið meðalgildi snúningsmótstöðu með jöfnunni í lið 3.2.4.1.1.2.3 í þessum undirviðauka.

3.2.4.1.1.2.2. Fyrir hjólbarða sem settir eru undir einstök ökutæki skal gildi veltiviðnámsstuðuls RR_{ind} stillt á gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka.

Í tilvikum þar sem hægt er að afhenda einstök ökutæki með heilu setti af venjulegum hjólum og hjólbörðum ásamt heilu setti af snjóhjólbörðum (með 3PMS-merkingu – fjall með þremur toppum og snjókorni (e. *3 Peaked Mountain and Snowflake*)) með eða án hjóla skulu viðbótarhjólin/-hjólbarðarnir ekki teljast sem valfrjáls búnaður.

Ef hjólbarðarnir á fram- og afturásum tilheyra mismunandi orkunýtniflokkum skal nota vegið meðaltal sem er reiknað út með jöfnunni í lið 3.2.4.1.1.2.3 þessum undirviðauka.

Ef sama snúningsmótstaða er notuð fyrir ökutæki L_M og H_M skal gildi RR_{ind} stillt á RR_{HM} fyrir aðferðina sem er beitt fyrir ökumótstöðufylkjahópinn.

3.2.4.1.1.2.3. Vegið meðaltal snúningsmótstöðu reiknað út

$$RR_x = (RR_{x,FA} \times mp_{x,FA}) + (RR_{x,RA} \times (1 - mp_{x,FA}))$$

þar sem:

x	táknar ökutæki L, H eða einstakt ökutæki,
$RR_{LM,FA}$ og $RR_{HM,FA}$	eru raungildi veltiviðnámsstuðla fyrir hjólbarða á framásum ökutækja L og H, í þeirri röð, í kg/tonn,
$RR_{ind,FA}$	er gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka fyrir hjólbarða á framásum einstakra ökutækja, í kg/tonn,
$RR_{LM,RA}$, og $RR_{HM,RA}$	eru raungildi veltiviðnámsstuðla fyrir hjólbarða á afturásum ökutækja L og H, í kg/tonn,
$RR_{ind,RA}$	er gildi veltiviðnámsstuðuls fyrir viðeigandi orkunýtniflokk hjólbarða í samræmi við töflu A4/2 í 4. undirviðauka fyrir hjólbarða á afturásum einstakra ökutækja, í kg/tonn,
$mp_{x,FA}$	er hlutfall massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs á framás.

Ekki skal námunda eða flokka RRx gildi að orkunýtniflokkum hjólbarða.“

v) Í stað orðanna „liður 1.2.1.3.1 í 6. undirviðauka“ (tvö tilvik) í lið 3.3.1.1 koma orðin „liður 2.1.3.1 í 6. undirviðauka“.

w) Í stað 4. liðar kemur eftirfarandi:

„4. Ákvörðun á fjölda efnisagna

Reikna skal fjölda efnisagna (PN) með eftirfarandi jöfnu:

$$PN = \frac{V \times k \times \left(\overline{C_s} \times \overline{f_r} - C_b \times \overline{f_{rb}}\right) \times 10^3}{d}$$

þar sem:

PN er fjöldi losaðra agna, í ögnum á kílómetra,

V er rúmmál þynnts útblásturslofts í lítrum í hverri prófun (aðeins eftir þynningu á fyrsta þrepi þegar um er að ræða tveggja þrepa þynningu) og leiðrétt að staðalskilyrðum (273,15 K (0 °C) og 101,325 kPa),

k er kvörðunarstuðull til að leiðrétta mælingu agnarteljara til móts við viðmiðunartækið ef þetta er ekki framkvæmt í agnateljaranum sjálfum. Ef kvörðunarstuðlinum er beitt innan agnateljarans skal nota gildið 1 fyrir kvörðunarstuðulinn,

$\overline{C_s}$ er leiðrétt agnaþéttni frá þynnta útblástursloftinu, gefið upp sem meðalgildi agnafjölda á hvern rúmsentimetra úr losunarprófuninni, og nær til allrar akstursloturnar. Ef niðurstöður meðalstyrks rúmmáls $\overline{C}$ úr agnateljaranum eru ekki mældar við staðalskilyrði (273,15 K (0 °C) og 101,325 kPa) skal styrkurinn leiðréttur að þeim skilyrðum $\overline{C_s}$,

C_b er bakgrunnsagnaþéttnin annaðhvort í þynningarloftinu eða í þynningarrörinu, eins og heimilað er af viðurkenningaryfirvaldinu, í efnisögnum á rúmsentimetra, leiðrétt fyrir tilviljunum og að staðalskilyrðum (273,15 K (0 °C) og 101,325 kPa),

$\overline{f_r}$ er skerðingarstuðull fjarlægingarbúnaðar fyrir rokgjarnar efnisagnir, fyrir meðalstyrk efnisagna, sértækur fyrir þá stillingu á þynningu sem notuð er í prófuninni,

$\overline{f_{rb}}$ er skerðingarstuðull fjarlægingarbúnaðar fyrir rokgjarnar efnisagnir, fyrir meðalstyrk efnisagna, sértækur fyrir þá stillingu á þynningu sem notuð er í bakgrunnsmælingum,

d er sú ekin vegalengd sem svarar til viðeigandi prófunarlotu, í km.

$\overline{C}$ skal reikna út með eftirfarandi jöfnu:

$$\overline{C} = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i}{n}$$

þar sem:

C_i er stakstæð mæling á agnaþéttni í þynnta útblástursloftinu frá agnateljaranum, í efnisögnum á cm^3 og leiðrétt fyrir tilviljunum,

n er heildarfjöldi stakstæðra mælinga á agnaþéttni sem gerðar eru meðan á viðeigandi prófunarlotu stendur og skal reiknaður út með eftirfarandi jöfnu:

$$n = t \times f$$

þar sem:

t er rauntími viðeigandi prófunarlotu, s,

f er tíðni gagnaskráningarinnar í agnateljaranum, Hz.“

x) Liður 4.1 fellur brott.

y) Í stað línunnar fyrir „v_i“ (þrjú tilvik) í 5. lið kemur eftirfarandi:

„v_i er markhraðinn á tímanum t_i, í km/klst,“.

z) Í stað liðar 6.2.1 kemur eftirfarandi:

„6.2.1. Nota skal almennu jöfnuna í lið 6.12 í þessum undirviðauka með hlutföll vetnis/kolefnis (H/C) og súrefnis/kolefnis (O/C) til að reikna út eldsneytisnotkun.“

aa) Í stað annarrar málsgreinar liðar 6.13 kemur eftirfarandi:

„Fyrir ökutæki sem knúin eru annaðhvort loftkenndu eða fljótandi vetni og með samþykki viðurkenningaryfirvaldsins getur framleiðandi valið að reikna út eldsneytisnotkun með því að nota annaðhvort jöfnuna fyrir eldsneytisnotkun (FC) hér á eftir eða með aðferð þar sem notuð er stöðluð aðferðarlýsing, svo sem SAE J2572.“

ab) Í stað 7. liðar og liða 7.1 og 7.2 kemur eftirfarandi:

„7. Stuðlar akstursferlis:

7.1. Almennar kröfur

Hraði sem mælt er fyrir um milli tímapunkta í töflum A1/1 til A1/12 skal ákvarðaður með línulegri brúun á tíðninni 10 Hz.

Ef eldsneytisgjöf er virkjuð að fullu skal nota þann hraða sem mælt er fyrir um í stað raunhraða ökutækisins við útreikning á stuðlum akstursferlis meðan á slíkum starfrækslutímabilum stendur.

Fyrir hrein rafökutæki skal útreikningur á stuðlum akstursferlis ná til allra WLTC-prófunarlota og fasa sem er lokið við áður en rofviðmiðun er náð eins og tilgreint er í lið 3.2.4.5 í 8. undirviðauka.

7.2. Útreikningur á stuðlum akstursferils

Eftirfarandi stuðlar skulu reiknaðir út í samræmi við SAE J2951 (endurskoðaður í janúar 2014):

a) IWR: Mat á tregðuvinnu (e. *Inertial work rating*), í %,

b) RMSSE: Kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika (e. *Root Mean Squared Speed Error*), í km/klst.

7.3. Viðmiðanir fyrir stuðla akstursferils

Ef um er að ræða gerðarviðurkenningarprófun skulu stuðlarnir uppfylla eftirfarandi viðmiðanir:

a) Mat á tregðuvinnu skal vera á sviðinu –2,0 til +4,0%,

b) kvaðratmeðaltalsrót hraðafrávika skal vera lægri en 1,3 km/klst.“

ac) Eftirfarandi 8. liður bætist við:

„8. Útreikningur á hlutfalli snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis

Reikna skal hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis með eftirfarandi jöfnu:

$$\left(\frac{n}{v}\right)_i = (r_i \times r_{axle} \times 60\,000)/(U_{dyn} \times 3{,}6)$$

þar sem:

n er snúningshraði hreyfils, í mín^{-1},

v er hraði ökutækis, í km/klst.,

r_i er yfirfærsluhlutfall í gír i,

r_{axle} er yfirfærsluhlutfall áss.

U_{dyn} er kvikt veltiummál hjólbarðanna á drifásnum og er reiknað út með eftirfarandi jöfnu:

$$U_{dyn} = 3{,}05 \times \left(2\left(\frac{H/W}{100}\right) \times W + (R \times 25{,}4)\right)$$

þar sem:

H/W er myndhlutfall hjólbarðans, t.d. „45“ í tilviki 225/45 R17 hjólbarða,

W er breidd hjólbarðans, í mm, t.d. „225“ í tilviki 225/45 R17 hjólbarða,

R er þvermál hjólsins, t.d. „17“ í tilviki 225/45 R17 hjólbarða.

Námunda skal U_{dyn} að heilum millimetrum.

Nota skal gildið fyrir hlutfall snúningshraða hreyfils og hraða ökutækis á helsta aflásnum ef fram- og afturásar hafa mismunandi U_{dyn} gildi. Láta skal viðurkenningaryfirvaldinu í té þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar vegna þessa vals, samkvæmt beiðni.“

35) Ákvæðum 8. undirviðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað liða 1.1 og 1.2 kemur eftirfarandi:

„1.1. Einingar, nákvæmni og upplausn rafmagnsmæliþátta

Einingar, nákvæmni og upplausn mælinga skulu vera eins og sýnt er í töflu A8/1.

Tafla A8/1

Einingar, nákvæmni og upplausn mælinga

Mæliþáttur	Einingar	Nákvæmni	Upplausn
Raforka (1)	Wh	±1%	0,001 kWh (2)
Rafstraumur	A	±0,3% fullt útslag eða ±1% af aflestrartölu (3) (4)	0,1 A
Rafspenna	V	±0,3% fullt útslag eða ±1% af aflestrartölu (3)	0,1 V

(1) Búnaður: rafeindur orkumælir fyrir raunorku.
(2) Riðstraumsvattstundamælir, í flokki 1 í samræmi við IEC 62053-21 eða jafngildur.
(3) Hvor talan sem er hærri.
(4) Tíðni tegrunar á straumi 20 Hz eða hærri.

1.2. Prófun á losun og eldsneytisnotkun

Mæliþættir, einingar og mælinákvæmni skulu vera þau sömu og krafist er fyrir hrein brunahreyfilsökutæki.“

b) Í stað töflu A8/2 í lið 1.3 kemur eftirfarandi:

„*Tafla A8/2*

Einingar og nákvæmni lokaniðurstaðna úr prófunum

Mæliþáttur	Einingar	Nákvæmni lokaniðurstaðna úr prófunum
$PER_{(p)}$ (2), PER_{city}, $AER_{(p)}$ (2), AER_{city}, $EAER_{(p)}$ (2), $EAER_{city}$, R_{CDA} (1), R_{CDC}	km	Námundað að næstu heilu tölu
$FC_{CS(,p)}$ (2), FC_{CD}, $FC_{weighted}$ fyrir tvinnrafökutæki	l/100 km	Námundað að einum aukastaf
$FC_{CS(,p)}$ (2) fyrir tvinnökutæki með efnarafala	kg/100 km	Námundað að tveimur aukastöfum
$M_{CO2,CS(,p)}$ (2), $M_{CO2,CD}$, $M_{CO2,weighted}$	g/km	Námundað að næstu heilu tölu

Mæliþáttur	Einingar	Nákvæmni lokaniðurstaðna úr prófunum
$EC_{(p)}$ (2), EC_{city}, $EC_{AC,CD}$, $EC_{AC,weighted}$	Wh/km	Námundað að næstu heilu tölu
E_{AC}	kWh	Námundað að einum aukastaf

(1) Enginn mæliþáttur fyrir einstakt ökutæki.
(2) (p): viðkomandi tímabil getur verið einn fasi, samsetning fasa eða öll lotan.“

c) Í stað liða 1.4.1.1 og 1.4.1.2 kemur eftirfarandi:

„1.4.1.1. Viðmiðunarprófunarloturnar í flokki 3 eru tilgreindar í lið 3.3 í 1. undirviðauka.

1.4.1.2. Beita má niðurskölunaraðferðinni í samræmi við liði 8.2.3 og 8.3 í 1. undirviðauka fyrir hrein rafökutæki í prófunarlotum í samræmi við lið 3.3 í 1. undirviðauka með því að nota hámarksnettóafl í stað nafnafls í samræmi við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 85. Niðurskalaða lotan er viðmiðunarprófunarlotan í slíku tilviki.“

d) Í stað liða 1.4.2.2 og 1.5 kemur eftirfarandi:

„1.4.2.2. Viðeigandi WLTP-borgarprófunarlota

WLTP-borgarprófunarlota ($WLTC_{city}$) í flokki 3 er tilgreind í lið 3.5 í 1. undirviðauka.

1.5. Tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu, tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og hrein rafökutæki með handskiptingu

Ökutækjum skal ekið í samræmi við tæknilega gírskiptivísinn, ef hann er til staðar, eða í samræmi við leiðbeiningar sem fram koma í handbók framleiðanda.“

e) Í stað 2. liðar og liða 2.1 og 2.2 kemur eftirfarandi:

„2. Tilkeyrsla prófunarökutækis

Ökutæki sem er prófað í samræmi við þennan viðauka skal vera í góðu tæknilegu ástandi og það skal tilkeyrt í samræmi við ráðleggingar framleiðanda. Ef endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi eru notuð við hitastig sem er yfir eðlilegu bili ganghita skal stjórnandi fylgja því ferli sem framleiðandi ökutækisins mælir með til að halda hitastigi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis innan eðlilegs ganghita þess. Framleiðandi skal færa sönnur á að varmastjórnunarkerfi endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins sé hvorki óvirkt né með skerta virkni.

2.1. Tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu skulu hafa verið tilkeyrð í samræmi við kröfurnar í lið 2.3.3 í 6. undirviðauka.

2.2. Tvinnökutæki með efnarafala, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu skulu hafa verið tilkeyrð a.m.k. 300 km með efnarafalann og endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið uppsett.“

f) Eftirfarandi liðir 2.3 og 2.4 bætast við:

„2.3. Hrein rafökutæki skulu hafa verið tilkeyrð a.m.k. 300 km eða vegalengd sem samsvarar einni heilli hleðslu, hvor heldur sem er lengri.

2.4. Öll endurhlaðanleg raforkugeymslukerfi sem hafa engin áhrif á massalosun koltvísýrings eða notkun vetnisgass skulu undanskilin frá vöktun.“

g) Í stað liðar 3.1.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.1.1.2. Ef ökutækið getur ekki fylgt viðeigandi prófunarlotu innan vikmarka hraðaferils í samræmi við lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka skal virkja stýringu eldsneytisgjafar að fullu, nema annað sé tekið fram, þar til nauðsynlegu hraðaferli er aftur náð.“

h) Í stað liðar 3.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.1.2. Þvinguð kæling eins og lýst er í lið 2.7.2 í 6. undirviðauka skal einungis eiga við um hleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu í samræmi við lið 3.2 í þessum undirviðauka og fyrir prófun á tvinnrafökutækjum, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu í samræmi við lið 3.3 í þessum undirviðauka.“

i) Í stað síðustu málsgreinar í lið 3.2.4.4 kemur eftirfarandi:

„Fyrir ökutæki sem hafa ekki hleðslugetu yfir alla viðeigandi WLTP-prófunarlotu er lokum afhleðsluprófunar 1 náð þegar merki birtist á stöðluðu mælaborði um að stöðva ökutækið eða þegar ökutækið víkur frá tilgreindum vikmörkum fyrir hraðaferli í fjórar samfelldar sekúndur eða lengur. Stýring eldsneytisgjafar skal stöðvuð og ökutækið hemlað svo það stöðvist innan 60 sekúndna.“

j) Í stað liðar 3.2.4.7 kemur eftirfarandi:

„3.2.4.7. Sérhver viðeigandi WLTP-prófunarlota innan afhleðsluprófunar 1 skal uppfylla viðeigandi markgildalosunarmörk samkvæmt lið 1.2 í 6. undirviðauka.“

k) Í stað liðar 3.2.5.3.3 kemur eftirfarandi:

„3.2.5.3.3. Prófunin samkvæmt lið 3.2.5.3.1 í þessum undirviðauka skal uppfylla viðeigandi markgildalosunarmörk í samræmi við lið 1.2 í 6. undirviðauka.“

l) Í stað liðar 3.3.1.1 kemur eftirfarandi:

„3.3.1.1. Ökutækin skulu formeðhöndluð í samræmi við lið 2.6 í 6. undirviðauka.

Til viðbótar við kröfurnar í lið 2.6 í 6. undirviðauka má stilla styrk hleðsluástandsins í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi með drifrafgeymi fyrir hleðsluprófunina í samræmi við tilmæli framleiðanda fyrir formeðhöndlunina til að fá prófun við rekstrarskilyrði í hleðsluham.“

m) Í stað liðar 3.3.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.3.1.2. Varmajafnvægi skal komið á í ökutækjum í samræmi við lið 2.7 í 6. undirviðauka.“

n) Í stað liðar 3.3.3.3 kemur eftirfarandi:

„3.3.3.3. Hleðsluprófun 1 skal uppfylla viðeigandi mörk fyrir markgildalosun í samræmi við lið 1.2 í 6. undirviðauka.“

o) Í stað liðar 3.4.1 kemur eftirfarandi:

„3.4.1. Almennar kröfur

Prófunaraðferðin til að ákvarða hreina rafdrægni og raforkunotkun skal valin í samræmi við áætlaða hreina rafdrægni (PER) prófunarökutækisins í töflu A8/3. Ef brúunaðaðferðinni er beitt skal velja viðeigandi prófunaraðferð í samræmi við hreina rafdrægni ökutækis H innan tiltekins brúunarhóps.

Tafla A8/3

Aðferðir til að ákvarða hreina rafdrægni og raforkunotkun

Viðeigandi prófunarlota	Áætluð hrein rafdrægni er...	Viðeigandi prófunaraðferð
Prófunarlota samkvæmt lið 1.4.2.1 í þessum undirviðauka.	... minni en lengdin á þremur viðeigandi WLTP-prófunarlotum.	Prófun 1 með samfelldri lotu (í samræmi við lið 3.4.4.1 í þessum undirviðauka)

Viðeigandi prófunarlota	Áætluð hrein rafdrægni er...	Viðeigandi prófunaraðferð
	... jafn mikil eða meiri en lengdin á þremur viðeigandi WLTP-prófunarlotum.	Stytt prófun 1 (í samræmi við lið 3.4.4.2 í þessum undirviðauka)
Borgarprófunarlota samkvæmt lið 1.4.2.2 í þessum undirviðauka.	... ekki tiltæk í viðeigandi WLTP-prófunarlotu.	Prófun 1 með samfelldri lotu (í samræmi við lið 3.4.4.1 í þessum undirviðauka)

Framleiðandi skal leggja fyrir viðurkenningaryfirvaldið sönnunargögn varðandi áætlaða hreina rafdrægni (PER) fyrir prófunina. Ef brúunaraðferðinni er beitt skal ákvarða viðeigandi prófunaraðferð á grunni á áætlaðrar hreinnar rafdrægni ökutækis H í brúunarhópi. Hrein rafdrægni sem er ákvörðuð með prófunaraðferðinni sem beitt er skal staðfesta að réttri prófunaraðferð hafi verið beitt.

Prófunarröðin fyrir prófun 1 með samfelldri lotu sem lýst er í liðum 3.4.2, 3.4.3 og 3.4.4.1 í þessum undirviðauka, ásamt samsvarandi mynstri hleðsluástands í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi, er sýnd á mynd A8.viðb.1/6 í 1. viðbæti við þennan undirviðauka.

Prófunarröðin fyrir stytta prófun 1 með samfelldri lotu sem lýst er í liðum 3.4.2, 3.4.3 og 3.4.4.2 í þessum undirviðauka, ásamt samsvarandi mynstri hleðsluástands í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi, er sýnd á mynd A8.viðb.1/7 í 1. viðbæti við þennan undirviðauka.“

p) Í stað liðar 3.4.3 kemur eftirfarandi:

„3.4.3. Valkvæður notkunarhamur valinn

Fyrir ökutæki sem eru búin valkvæðum notkunarham skal velja haminn fyrir prófun skv. 4. lið í 6. viðbæti við þennan undirviðauka.“

q) Í stað síðustu málsgreinar í lið 3.4.4.1.1 kemur eftirfarandi:

„Hlé fyrir ökumann og/eða stjórnanda eru einungis leyfð milli prófunarlota og með 10 mínútna hámarkstíma fyrir hlé. Slökkva skal á aflrás meðan á hléi stendur.“

r) Í stað liðar 3.4.4.1.3 kemur eftirfarandi:

„3.4.4.1.3. Rofviðmiðun

Rofviðmiðun er náð þegar ökutæki fer yfir vikmörk hraðaferils sem mælt er fyrir um, eins og tilgreint er í lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka, í fjórar samfelldar sekúndur eða lengur. Stöðva skal stýringu eldsneytisgjafar. Ökutækið skal hemlað svo það stöðvist innan 60 sekúndna.“

s) Í stað fyrstu málsgreinar á eftir mynd A8/2 í lið 3.4.4.2.1 kemur eftirfarandi:

„Kvikir áfangar DS_1 og DS_2 eru notaðir til að reikna út orkunotkunina í viðkomandi fasa, í viðeigandi WLTP-borgarprófunarlotu og viðeigandi WLTP-prófunarlotu.“

t) Í stað liðar 3.4.4.2.1.1 kemur eftirfarandi:

„3.4.4.2.1.1. Kvikir áfangar

Hver kvikur áfangi DS_1 og DS_2 felur í sér viðeigandi WLTP-prófunarlotu í samræmi við lið 1.4.2.1 í þessum undirviðauka og þar á eftir viðeigandi WLTP-borgarprófunarlotu í samræmi við lið 1.4.2.2 í þessum undirviðauka.“

u) Í stað fyrstu málsgreinar í lið 3.4.4.2.1.2 kemur eftirfarandi:

„Stöðugur hraði í áföngum CSS_M og CSS_E skal vera nákvæmlega eins. Ef brúunaraðferðinni er beitt skal nota sama stöðuga hraðann innan tiltekins brúunarhóps.“

v) Í stað lýsingarinnar á dálkunum í töflu A8/4 í lið 3.4.4.2.1.3 kemur eftirfarandi:

„Vegalengd sem ekin er í áfanga með stöðugum hraða CSS_M (km)	Hámarkstími fyrir hlé (mín)“

w) Í stað liðar 3.4.4.2.3 kemur eftirfarandi:

„3.4.4.2.3. Rofviðmiðun

Rofviðmiðun er náð þegar ökutæki fer yfir þau vikmörk fyrir hraðaferli sem mælt er fyrir um, eins og tilgreint er í lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka, í fjórar samfelldar sekúndur eða lengur í öðrum áfanga með stöðugum hraða CSS_E. Stöðva skal stýringu eldsneytisgjafar. Ökutækið skal hemlað svo það stöðvist innan 60 sekúndna.“

x) Lið 4.1.1.1 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrirsagnarinnar kemur eftirfarandi:

„Þrepaskipt aðferð fyrir útreikning á lokaniðurstöðum úr prófunum í hleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu“.

ii. Í stað töflu A8/5 kemur eftirfarandi:

„*Tafla A8/5*

Útreikningur endanlegra gilda fyrir losun lofttegunda í hleðsluham

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
6. undirviðauki	Óunnar niðurstöður úr prófun	Massi losunar í hleðsluham liður 3 til 3.2.2 í 7. undirviðauka.	$M_{i,CS,p,1}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,1}$, g/km.	1
Frálag úr þrepi nr. 1 í þessari töflu.	$M_{i,CS,p,1}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,1}$, g/km.	Útreikningur á samanlögðum gildum úr prófunarlotu í hleðsluham: $M_{i,cs,c,2} = \frac{\sum_p M_{i,cs,p,1} \times d_p}{\sum_p d_p}$ $M_{CO2,cs,c,2} = \frac{\sum_p M_{CO2,cs,p,1} \times d_p}{\sum_p d_p}$ þar sem: $M_{i,CS,c,2}$ er niðurstaða fyrir massalosun í hleðsluham í heildarlotu, $M_{CO2,CS,c,2}$ er niðurstaða fyrir massalosun koltvísýrings í hleðsluham fyrir heildarlotuna, d_p er sú vegalengd sem ekin er í lotufösunum, p.	$M_{i,CS,c,2}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,2}$, g/km.	2
Frálag úr þrepum nr. 1 og 2 í þessari töflu.	$M_{CO2,CS,p,1}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,2}$, g/km.	Leiðrétting á breytingu á raforku í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi Samkvæmt lið 4.1.1.2 til 4.1.1.5 í þessum undirviðauka.	$M_{CO2,CS,p,3}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,3}$, g/km.	3

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálag úr þrepum nr. 2 og 3 í þessari töflu.	$M_{i,CS,c,2}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,3}$, g/km.	Leiðrétting á massalosun í hleðsluham fyrir öll ökutæki sem eru búin kerfum sem endurnýja sig reglubundið, K_i, í samræmi við 1. viðbæti 6. undirviðauka. $M_{i,CS,c,4} = K_i \times M_{i,CS,c,2}$ eða $M_{i,CS,c,4} = K_i + M_{i,CS,c,2}$ og $M_{CO2,CS,c,4} = K_{CO2,K_i} \times M_{CO2,CS,c,3}$ eða $M_{CO2,CS,c,4} = K_{CO2,K_i} + M_{CO2,CS,c,3}$ Viðbótarjöfnun eða margfaldandi stuðull sem nota skal í samræmi við K_i ákvörðun. Ef K_i á ekki við: $M_{i,CS,c,4} = M_{i,CS,c,2}$ $M_{CO2,CS,c,4} = M_{CO2,CS,c,3}$	$M_{i,CS,c,4}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,4}$, g/km.	4a
Frálag úr þrepum nr. 3 og 4a í þessari töflu.	$M_{CO2,CS,p,3}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,3}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,4}$, g/km.	Ef K_i á við skal samræma fasagildi koltvísýrings að sameinuðu lotugildi: $M_{CO2,CS,p,4} = M_{CO2,CS,p,3} \times AF_{Ki}$ fyrir hvern lotufasa p, þar sem: $AF_{Ki} = \frac{M_{CO2,CS,c,4}}{M_{CO2,CS,c,3}}$ Ef K_i á ekki við: $M_{CO2,CS,p,4} = M_{CO2,CS,p,3}$	$M_{CO2,CS,p,4}$, g/km.	4b
Frálag úr þrepi nr. 4 í þessari töflu.	$M_{i,CS,c,4}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,4}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,4}$, g/km.	ATCT-leiðrétting í samræmi lið 3.8.2 í 6. undirviðauka a. Spillistuðlar eru reiknaðir út og beitt í samræmi við VII. viðauka.	$M_{i,CS,c,5}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,5}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,5}$, g/km.	5 Niðurstaða úr stakri prófun.
Frálag úr þrepi nr. 5 í þessari töflu.	Fyrir hverja prófun: $M_{i,CS,c,5}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,5}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,5}$, g/km.	Meðaltal prófana og yfirlýsts gildis í samræmi við lið 1.2 til 1.2.3 í 6. undirviðauka.	$M_{i,CS,c,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,declared}$, g/km.	6 $M_{i,CS}$ niðurstöður úr prófun 1 fyrir prófunarökutæki.
Frálag úr þrepi nr. 6 í þessari töflu.	$M_{CO2,CS,c,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,declared}$, g/km.	Samræming fasagilda. Liður 1.2.4 í 6. undirviðauka, og: $M_{CO2,CS,c,7} = M_{CO2,CS,c,declared}$	$M_{CO2,CS,c,7}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,7}$, g/km.	7 $M_{CO2,CS}$ niðurstöður úr prófun 1 fyrir prófunarökutæki.

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálag úr þrepum nr. 6 og 7 í þessari töflu.	Fyrir hvort prófunarökutæki H og L: $M_{i,CS,c,6}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,7}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,7}$, g/km.	Gildið fyrir markgildalosun sem verður ef prófunarökutæki L og, ef við á, ökutæki M er prófað til viðbótar við prófunarökutæki H skal vera það hærra af þessum tveimur, eða, ef við á, þremur gildum og vísað til þess sem $M_{i,CS,c}$. Tilkynna á hæsta gildið af þeirri summu sem vísar til annaðhvort ökutækis H eða ökutækis L eða, ef við á, ökutækis M ef um er að ræða samþætta losun á heildarmagni vetniskolefna + köfnunarefnisoxíði. Að öðrum kosti er $M_{i,CS,c} = M_{i,CS,c,6}$ ef ekkert ökutæki L eða, ef við á, ökutæki M er prófað Fyrir koltvísýring skal nota gildin sem fengin voru í þrepi nr. 7 í þessari töflu. Námunda skal gildi koltvísýrings að tveimur aukastöfum.	$M_{i,CS,c}$, g/km; $M_{CO2,CS,c,H}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,H}$, g/km. Ef ökutæki L var prófað: $M_{CO2,CS,c,L}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,L}$, g/km. og, ef við á, ökutæki M var prófað: $M_{CO2,CS,c,M}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,M}$, g/km.	8 Niðurstaða brúunarhóps. Endanlegar niðurstöður markgildalosunar.
Frálag úr þrepi nr. 8 í þessari töflu.	$M_{CO2,CS,c,H}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,H}$, g/km. Ef ökutæki L var prófað: $M_{CO2,CS,c,L}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,L}$, g/km, og, ef við á, ökutæki M var prófað: $M_{CO2,CS,c,M}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,M}$, g/km.	Útreikningur á massalosun koltvísýrings í samræmi við lið 4.5.4.1 í þessum undirviðauka fyrir einstök ökutæki í brúunarhópi. Námunda skal koltvísýringsgildi í samræmi við töflu A8/2.	$M_{CO2,CS,c,ind}$, g/km; $M_{CO2,CS,p,ind}$, g/km.	9 Niðurstaða fyrir stakt ökutæki. Endanlegar niðurstöður koltvísýrings.“

y) Í stað línunnar fyrir "$M_{CO2,CS}$“ í lið 4.1.1.3 kemur eftirfarandi:

„$M_{CO2,CS}$ er massalosun koltvísýrings í hleðsluham í hleðsluprófun 1 samkvæmt þrepi nr. 3 í töflu A8/5, í g/km,“.

z) Í stað línanna fyrir „$M_{CO2,CS,p}$“ og „$M_{CO2,CS,nb,p}$“ í lið 4.1.1.4 kemur eftirfarandi:

„$M_{CO2,CS,p}$ er massalosun koltvísýrings í hleðsluham í fasa p í hleðsluprófun 1 í samræmi við þrep nr. 3 í töflu A8/5, í g/km,

$M_{CO2,CS,nb,p}$ er ójöfnuð massalosun koltvísýrings í fasa p í hleðsluprófun 1, sem er ekki leiðrétt fyrir orkujöfnuð, ákvörðuð í samræmi við þrep nr. 1 í töflu A8/5, í g/km,“.

aa) Í stað línunnar „$M_{CO2,CS,nb,p}$“ í lið 4.1.1.5 kemur eftirfarandi:

„$M_{CO2,CS,nb,p}$ er ójöfnuð massalosun koltvísýrings í fasa p í hleðsluprófun 1, sem er ekki leiðrétt fyrir orkujöfnuð, ákvörðuð í samræmi við þrep nr. 1 í töflu A8/5, í g/km,“.

ab) Í stað síðustu tveggja málsgreinanna í lið 4.1.2 kemur eftirfarandi:

„Ef brúunaraðferðinni er beitt skal k vera fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu ökutækis L n_{veh_L}.

Staðfestingarlota ökutækis H og n_{veh_H}, ef við á, einstaks ökutækis, skal höfð með í útreikningi ef fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki H og, ef við á, með einstöku ökutæki innan brúunarhóps ökutækis, $n_{veh_{ind}}$er minni en fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki L, n_{veh_L}. Massalosun koltvísýrings í hverjum fasa staðfestingarlotunnar skal síðan leiðrétt að núll raforkunotkun $EC_{DC,CD,j}$ = 0 með því að nota leiðréttingarstuðul fyrir koltvísýring í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka.“

ac) Í stað síðustu tveggja málsgreinanna í lið 4.1.3.1 kemur eftirfarandi:

„Ef brúunaraðferðinni er beitt fyrir i = CO_2 skal k vera fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu ökutækis L n_{veh_L}.

Staðfestingarlota ökutækis H og n_{veh_H}, ef við á, einstaks ökutækis, skal höfð með í útreikningi ef fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki H og, ef við á, með einstöku ökutæki innan brúunarhóps ökutækis, $n_{veh_{ind}}$ er minni en fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki L, n_{veh_L}. Massalosun koltvísýrings í hverjum fasa staðfestingarlotunnar skal síðan leiðrétt að núll raforkunotkun $EC_{DC,CD,j}$ = 0 með því að nota leiðréttingarstuðul fyrir koltvísýring í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka.“

ad) Lið 4.2.1.2.1 er breytt sem hér segir:

i. Í stað fyrirsagnarinnar kemur eftirfarandi:

„4.2.1.2.1. Þrepaskipt aðferð fyrir útreikning á lokaniðurstöðum fyrir endanlega eldsneytisnotkun úr prófunum í hleðsluprófun 1 fyrir tvinnökutæki með efnarafala sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu“.

ii. Í stað línunnar fyrir þrep nr. 3 í töflu A8/7 kemur eftirfarandi:

„Frálag úr þrepi nr. 2 í þessari töflu.	$FC_{CS,c,2}$, í kg/100 km.	$FC_{CS,c,3} = FC_{CS,c,2}$	$FC_{CS,c,3}$, í kg/100 km.	3 Niðurstaða úr stakri prófun.“

iii. Í stað línunnar fyrir þrep nr. 4 í töflu A8/7 kemur eftirfarandi:

„Frálag úr þrepi nr. 3 í þessari töflu.	Fyrir hverja prófun: $FC_{CS,c,3}$, í kg/100 km.	Meðaltal prófana og yfirlýsts gildis samkvæmt liðum 1.2 til og með 1.2.3 í 6. undirviðauka.	$FC_{CS,c,4}$, í kg/100 km.	4“

ae) Í stað síðustu tveggja málsgreinanna í lið 4.2.2 kemur eftirfarandi:

„Ef brúunaraðferðinni er beitt skal k vera fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu ökutækis L n_{veh_L}.

Staðfestingarlota ökutækis H og n_{veh_H}, ef við á, einstaks ökutækis, skal höfð með í útreikningi ef fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki H og, ef við á, með einstöku ökutæki innan brúunarhóps ökutækis, $n_{veh_{ind}}$er minni en fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki L n_{veh_L}. Eldsneytisnotkun í hverjum fasa staðfestingarlotunnar í samræmi við 6. lið í 7. undirviðauka skal reiknuð út með því að nota markgildalosun fyrir alla staðfestingarlotuna og viðeigandi koltvísýringsgildi í fasa sem skal vera leiðrétt að núll raforkunotkun $EC_{DC,CD,j}$ = 0 með því að nota leiðréttingarstuðul fyrir koltvísýring (K_{CO2}) í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka.“

af) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á lið 4.2.3:

i. Í stað síðustu tveggja málsgreina kemur eftirfarandi:

„Ef brúunaraðferðinni er beitt skal k vera fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu ökutækis L n_{veh_L}.

Staðfestingarlota ökutækis H og n_{veh_H}, ef við á, einstaks ökutækis skal höfð með í útreikningi ef fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki H og, ef við á, með einstöku ökutæki innan brúunarhóps ökutækis, $n_{veh_{ind}}$ er minni en fjöldi umbreytingarlotna sem keyrðar eru með ökutæki L, n_{veh_L}.“

ii. Eftirfarandi málsgrein bætist við:

„Eldsneytisnotkun í hverjum fasa staðfestingarlotunnar í samræmi við 6. lið í 7. undirviðauka skal reiknuð út með því að nota markgildalosun fyrir alla staðfestingarlotuna og viðeigandi koltvísýringsgildi í fasa sem skal vera leiðrétt að núll raforkunotkun $EC_{DC,CD,j} = 0$ með því að nota leiðréttingarstuðul fyrir koltvísýring (K_{CO2}) í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka.“

ag) Í stað liðar 4.3.1 kemur eftirfarandi:

„4.3.1. Raforkunotkun í afhleðsluham byggð á endurhlaðinni raforku frá rafveitu, vegin með nýtingarstuðli, fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu

Raforkunotkun í afhleðsluham byggð á endurhlaðinni raforku frá rafveitu, vegin með nýtingarstuðli, skal reiknuð út með eftirfarandi jöfnu:

$$EC_{AC,CD} = \frac{\sum_{j=1}^{k}(UF_j \times EC_{AC,CD,j})}{\sum_{j=1}^{k} UF_j}$$

þar sem:

$EC_{AC,CD}$ er raforkunotkun í afhleðsluham byggð á endurhlaðinni raforku frá rafveitu, vegin með nýtingarstuðli, í Wh/km,

UF_j er nýtingarstuðull fasa j í samræmi við 5. viðbæti við þennan undirviðauka,

$EC_{AC,CD,j}$ er raforkunotkun byggð á endurhlaðinni raforku frá rafveitu í fasa j, í Wh/km,

og

$$EC_{AC,CD,j} = EC_{DC,CD,j} \times \frac{E_{AC}}{\sum_{j=1}^{k} \Delta E_{REESS,j}}$$

þar sem:

$EC_{DC,CD,j}$ er raforkunotkun byggð á afhleðslu endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis í fasa j í afhleðsluprófun 1, í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka, í Wh/km,

E_{AC} er endurhlaðin raforka frá rafveitu ákvörðuð í samræmi við lið 3.2.4.6 í þessum undirviðauka, í Wh,

$\Delta E_{REESS,j}$ er breyting á raforku í öllum endurhlaðanlegum raforkugeymslukerfum í fasa j í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka, í Wh,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi fasa,

k er fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu n í samræmi við lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka.
Ef brúunaraðferðinni er beitt er k fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu L, n_{veh_L}.“

ah) Textanum í lið 4.3.2:

„k er fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu fyrir ökutæki L, n_{veh_L}, í samræmi við lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka.“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„k er fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotunnar samkvæmt lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka.

Ef brúunaraðferðinni er beitt er k fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu L, n_{veh_L}.“

ai) Í stað liðar 4.3.4.1 kemur eftirfarandi:

„4.3.4.1. Einungis skal reikna út þá raforkunotkun sem er ákvörðuð í þessum lið ef ökutæki gat fylgt viðeigandi prófunarlotu innan vikmarka hraðaferils í samræmi við lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka á öllu viðkomandi tímabili.

aj) Í stað annarrar jöfnu og tengdra skilgreininga í lið 4.4.1.2.2 kemur eftirfarandi:

„$UBE_{city} = \sum_{j=1}^{k+1} \Delta E_{REESS,j}$

þar sem:

$\Delta E_{REESS,j}$ Er breyting á raforku í öllum endurhlaðanlegum raforkugeymslukerfum í fasa j, í Wh,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi fasa,

k + 1 er fjöldi keyrðra fasa frá upphafi prófunar fram að þeim tímapunkti þegar eldsneytisnotkun hefst í brunahreyflinum,“.

ak) Í stað liðar 4.4.2 kemur eftirfarandi:

„4.4.2. Hrein rafdrægni hreinna rafökutækja

Einungis skal reikna út þá drægni sem er ákvörðuð í þessum lið ef ökutækið gat fylgt viðeigandi WLTP-prófunarlotu innan vikmarka hraðaferils í samræmi við lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka á öllu viðkomandi tímabili.“

al) Textanum í lið 4.4.2.1.1:

„$EC_{DC,WLTC,j}$ er raforkunotkun fyrir viðeigandi WLTP-prófunarlotu í DS_j með styttri prófun 1, Wh/km, samkvæmt lið 4.3 í þessum undirviðauka,“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„$EC_{DC,WLTC,j}$ er raforkunotkun fyrir viðeigandi WLTP-prófunarlotu í DS_j með styttri prófun 1, í Wh/km, samkvæmt lið 4.3 í þessum undirviðauka,“.

am) Textanum eftir fyrstu jöfnuna í lið 4.4.2.1.3:

„UBE_{UBE} er nothæf orka í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi í samræmi við lið 4.4.2.1.1 í þessum undirviðauka, Wh,“

er skipt út fyrir eftirfarandi:

„UBE_{STP} er nothæf orka í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi í samræmi við lið 4.4.2.1.1 í þessum undirviðauka, í Wh,“.

an) Í stað liðar 4.4.4.2 kemur eftirfarandi:

„4.4.4.2. Ákvörðun fasatengdrar jafngildrar fullrar rafdrægni og jafngildrar, fullrar rafdrægni í þéttbýli

Reikna skal út jafngildi fullrar rafdrægni (EAER) í fasa og í þéttbýli með eftirfarandi jöfnu:

$$EAER_p = \left(\frac{M_{CO_2,CS,p} - M_{CO_2,CD,avg,p}}{M_{CO_2,CS,p}}\right) \times \frac{\sum_{j=1}^{k} \Delta E_{REESS,j}}{EC_{DC,CD,p}}$$

þar sem:

$EAER_p$ er jafngild full rafdrægni fyrir viðkomandi tímabil p, í km,

$M_{CO_2,CS,p}$ er fasatengd massalosun koltvísýrings úr hleðsluprófun 1 fyrir viðkomandi tímabil p í samræmi við þrep nr. 7 í töflu A8/5, í g/km,

$\Delta E_{REESS,j}$ eru breytingar á raforku í öllum endurhlaðanlegum raforkugeymslukerfum meðan á viðkomandi fasa j stendur, í Wh,

$EC_{DC,CD,p}$ er raforkunotkun á viðkomandi tímabili p byggð á afhleðslu endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis, í Wh/km,

j er skrárnúmer fyrir viðkomandi fasa,

k er fjöldi fasa sem keyrðir eru fram að lokum umbreytingarlotu n samkvæmt lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka.

og

$$M_{CO_2,CD,avg,p} = \frac{\sum_{c=1}^{n_c}\left(M_{CO_2,CD,p,c} \times d_{p,c}\right)}{\sum_{c=1}^{n_c} d_{p,c}}$$

þar sem:

$M_{CO_2,CD,avg,p}$ er meðalgildi massalosunar koltvísýrings í afhleðsluham fyrir viðkomandi tímabil p, í g/km,

$M_{CO_2,CD,p,c}$ er massalosun koltvísýrings ákvörðuð samkvæmt lið 3.2.1 í 7. undirviðauka á tímabili p í lotu c í afhleðsluprófun 1, í g/km,

$d_{p,c}$ er ekin vegalengd á viðkomandi tímabili p í lotu c í afhleðsluprófun 1, í km,

c er skrárnúmerið fyrir viðeigandi WLTP-prófunarlotu,

p er skrárnúmer fyrir einstakt tímabil innan viðeigandi WLTP-prófunarlotu,

n_c er fjöldi viðeigandi WLTP-prófunarlotna sem keyrðar eru fram að lokum umbreytingarlotu n samkvæmt lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka,

og

$$EC_{DC,CD,p} = \frac{\sum_{c=1}^{n_c} EC_{DC,CD,p,c} \times d_{p,c}}{\sum_{c=1}^{n_c} d_{p,c}}$$

þar sem:

$EC_{DC,CD,p}$ er raforkunotkun á tímabili p sem um ræðir byggð á afhleðslu endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis í afhleðsluprófun 1, í Wh/km,

$EC_{DC,CD,p,c}$ er raforkunotkun á viðkomandi tímabili p í lotu c byggð á afhleðslu endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis í afhleðsluprófun 1, í Wh/km, samkvæmt lið 4.3 í þessum undirviðauka,

$d_{p,c}$ er ekin vegalengd á viðkomandi tímabili p í lotu c í afhleðsluprófun 1, í km,

c er skrárnúmerið fyrir viðeigandi WLTP-prófunarlotu,

p er skrárnúmer fyrir einstakt tímabil innan viðeigandi WLTP-prófunarlotu,

n_c er fjöldi viðeigandi WLTP-prófunarlotna sem keyrðar eru fram að lokum umbreytingarlotu n samkvæmt lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka.

Viðkomandi fasagildin skulu vera lágfasa-, miðfasa-, háfasa-, hæsta fasa aksturslota og borgarakst-urslota.“

ao) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á lið 4.5.1:

i. Í stað fyrstu tveggja málsgreinanna á eftir fyrirsögninni kemur eftirfarandi:

Brúunaraðferðinni skal einungis beitt ef munurinn á massalosun koltvísýrings í hleðsluham $M_{CO2,CS}$, samkvæmt þrepi nr. 8 í töflu A8/5, á milli prófunarökutækja L og H er milli lágmarksins 5 g/km og hámarksins 20% auk 5 g/km af massalosun koltvísýrings í hleðsluham $M_{CO2,CS}$, samkvæmt þrepi nr. 8 í töflu A8/5 fyrir ökutæki H, en a.m.k. 15 g/km og að hámarki 20 g/km.

Að beiðni framleiðanda og með samþykkt viðurkenningaryfirvalds má framlengja framkvæmd brúunaraðferðar fyrir gildi einstakra ökutækja innan hóps ef hámark framreiknings er ekki meira en 3 g/km umfram massalosun koltvísýrings í hleðsluham í ökutæki H og/eða er ekki meira en 3 g/km undir massalosun koltvísýrings í hleðsluham í ökutæki L. Þessi framlenging gildir einungis innan þeirra nákvæmu marka brúunarsviðs sem tilgreind eru í þessum lið.“

ii. Í stað sjöttu málsgreinar á eftir fyrirsögninni kemur eftirfarandi:

„Ef línuleikaviðmiðunin er uppfyllt skal brúunaraðferðin eiga við um öll einstök ökutæki milli ökutækja L og H innan brúunarhópsins.“

iii. Í stað síðustu tveggja málsgreinanna kemur eftirfarandi:

„Fyrir ökutæki með orkuþörf í lotu sem er á milli ökutækja L og M skal samsvarandi mæliþáttur fyrir ökutæki M notaður í stað fyrir hvern mæliþátt fyrir ökutæki H sem er nauðsynlegur til að nota brúunaraðferðina fyrir einstök gildi fyrir tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu og fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu.

Fyrir ökutæki með orkuþörf í lotu sem er á milli ökutækja M og H skal samsvarandi mæliþáttur fyrir ökutæki M notaður í stað fyrir hvern mæliþátt fyrir ökutæki L sem er nauðsynlegur til að nota brúunaraðferðina fyrir einstök gildi fyrir tvinnrafökutæki, sem er ætluð fyrir ytri hleðslu og fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu.“

ap) Í stað línanna fyrir „$K_{ind,p}$“, „$E_{1,p}$“, „$E_{2,p}$“, „$E_{3,p}$“ og „p“ í lið 4.5.3 kemur eftirfarandi:

„$K_{ind,p}$ er brúunarstuðull fyrir einstök ökutæki sem um ræðir fyrir tímabil p,

$E_{1,p}$ er orkuþörf fyrir tímabilið sem um ræðir fyrir ökutæki L í samræmi við 5. lið í 7. undirviðauka, í Ws,

$E_{2,p}$ er orkuþörf fyrir tímabilið sem um ræðir fyrir ökutæki H í samræmi við 5. lið í 7. undirviðauka, í Ws,

$E_{3,p}$ er orkuþörf fyrir tímabilið sem um ræðir fyrir einstök ökutæki í samræmi við 5. lið í 7. undirviðauka, í Ws,

p er skrárnúmer fyrir einstakt tímabil innan viðeigandi prófunarlotu.“

aq) Í stað síðustu málsgreinar í lið 4.5.4.1 kemur eftirfarandi:

„Tímabilin sem um ræðir skulu vera lágfasa-, miðfasa-, háfasa-, hæsta fasa lota og viðeigandi WLTP-prófunarlota.“

ar) Í stað síðustu málsgreinar í lið 4.5.5.1 kemur eftirfarandi:

„Tímabilin sem um ræðir skulu vera lágfasa-, miðfasa-, háfasa-, hæsta fasa lota og viðeigandi WLTP-prófunarlota.“

as) Í stað síðustu málsgreinar í lið 4.5.6.3 kemur eftirfarandi:

„Tímabilin sem um ræðir skulu vera lágfasa-, miðfasa-, háfasa-, hæsta fasa lota, viðeigandi WLTP-borgarprófunarlota og viðeigandi WLTP-prófunarlota.“

at) Í stað síðustu málsgreinar í lið 4.5.7.2 kemur eftirfarandi:

„Tímabilin sem um ræðir skulu vera lágfasa-, miðfasa-, háfasa-, hæsta fasa lota, viðeigandi WLTP-borgarprófunarlota og viðeigandi WLTP-prófunarlota.“

au) Eftirfarandi liðir 4.6. til 4.7.2. bætast við:

„4.6. Þrepskipt aðferð til að reikna út endanlegar niðurstöður úr prófunum á tvinnrafökutækjum ætluðum fyrir ytri hleðslu

Í liðum 4.6.1 og 4.6.2 í þessum undirviðauka er lýsing á þrepskiptum útreikningi á endanlegum niðurstöðum úr afhleðsluprófunum og einnig á vegnum niðurstöðum úr hleðsluprófunum og afhleðsluprófunum, til viðbótar við þrepskiptu aðferðina til að reikna út endanlegar niðurstöður úr hleðsluprófunum á losun loftkenndra efnasambanda í samræmi við lið 4.1.1.1 í þessum undirviðauka og á eldsneytisnotkun í samræmi við lið 4.2.1.1 í þessum undirviðauka.

4.6.1. Þrepaskipt aðferð fyrir útreikning á lokaniðurstöðum úr prófunum í afhleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu

Reikna skal út niðurstöðurnar í þeirri röð sem lýst er í töflu A8/8. Allar viðeigandi niðurstöður í dálkinum „Frálag“ skulu skráðar. Dálkurinn „Ferli“ tilgreinir þá liði sem nota á fyrir útreikninga eða inniheldur viðbótarútreikninga.

Að því er varðar töflu A8/8 er eftirfarandi flokkunarkerfi notað innan jafnanna og niðurstaðanna:

c	heil viðeigandi prófunarlota,
p	sérhver gildandi lotufasi,
i	viðeigandi markgildalosunarþáttur,
CS	hleðsla,
Koltvísýringur (CO_2)	massalosun koltvísýrings.

Tafla A8/8

Útreikningur á endanlegum gildum úr afhleðsluprófun

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
8. undirviðauki	Niðurstöður úr afhleðsluprófun	Niðurstöður eru mældar í samræmi við 3. viðbæti við þennan undirviðauka og reiknaðar út fyrir fram í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka.	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh; d_j, í km,	1
		Nothæf orka í rafgeymi í samræmi við lið 4.4.1.2.2 í þessum undirviðauka.	UBE_{city}, í Wh,	
		Endurhlaðin raforka í samræmi við lið 3.2.4.6 í þessum undirviðauka.	E_{AC}, í Wh,	
		Orkuþörf fyrir lotu í samræmi við 5. lið í 7. undirviðauka.	E_{cycle}, í Ws,	
		Massalosun koltvísýrings í samræmi við lið 3.2.1 í 7. undirviðauka.	$M_{CO2,CD,j}$, í g/km,	
		Massalosun loftkennds efnasambands i í samræmi við lið 3.2.1 í 7. undirviðauka.	$M_{i,CD,j}$, í g/km,	
		Fjöldi losaðra agna í samræmi við 4. lið í 7. undirviðauka.	$PN_{CD,j}$, í ögnum á kílómetra,	
		Agnamassalosun í samræmi lið 3.3 í 7. undirviðauka.	$PM_{CD,c}$, í mg/km,	
		Full rafdrægni (AER) sem er ákvörðuð í samræmi við lið 4.4.1.1 í þessum undirviðauka.	AER, í km,	

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
		Ef ekið er gegnum viðeigandi WLTC-borgarprófunarlotu: full rafdrægni í borg í samræmi við lið 4.4.1.2.1 í þessum undirviðauka.	AER_{city}, í km.	
		Leiðréttingarstuðull fyrir massalosun koltvísýrings K_{CO2} getur verið nauðsynlegur í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið (að frátöldu K_{CO2}) er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	K_{CO2}, í (g/km)/(Wh/km).	
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, E_{cycle}, í Ws.	Útreikningur á hlutfallslegri breytingu á raforku í hverri prófunarlotu í samræmi við lið 3.2.4.5.2 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun og hverja viðeigandi WLTP-prófunarlotu. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$REEC_i$.	2
Frálagsþrep 2	$REEC_i$.	Ákvörðun á umbreytingarlotu og staðfestingarlotu í samræmi við lið 3.2.4.4 í þessum undirviðauka. Ef fleiri en ein afhleðsluprófun er tiltæk fyrir eitt fyrirtæki skal hver prófun hafa sama fjölda af umbreytingarlotum n_{veh} að því er varðar útreikning á meðalgildum.	n_{veh},	3
		Ákvörðun á drægni í afhleðslulotu í samræmi við lið 4.4.3 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	R_{CDC}, í km.	
Frálagsþrep 3	n_{veh},	Ákvarða skal umbreytingarlotuna fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt. Athuga skal hvort viðmiðun um brúun er uppfyllt í samræmi við d-lið liðar 5.6.2 í þessum viðauka.	$n_{veh,L}$, $n_{veh,H}$, ef við á $n_{veh,M}$.	4

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1	$M_{i,CD,j}$, í g/km, $PM_{CD,c}$, í mg/km, $PN_{CD,j}$, í ögnum á kílómetra.	Útreikningur á samanlögðum gildum fyrir losun í n_{veh} lotum ef um er að ræða brúun fyrir $n_{veh,L}$ lotur fyrir hvert ökutæki. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$M_{i,CD,c}$, í g/km, $PM_{CD,c}$, í mg/km, $PN_{CD,c}$, í ögnum á kílómetra.	5
Frálagsþrep 5	$M_{i,CD,c}$, í g/km, $PM_{CD,c}$, í mg/km, $PN_{CD,c}$, í ögnum á kílómetra.	Meðaltalsreikningur losunar í prófunum í hverri viðeigandi WLTP-prófunarlotu í afhleðsluprófun 1 og athuganir hvort farið sé að mörkum í samræmi við töflu A6/2 í 6. undirviðauka.	$M_{i,CD,c,ave}$, í g/km, $PM_{CD,c,ave}$, í mg/km, $PN_{CD,c,ave}$, í ögnum á kílómetra.	6
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, $dj_{,j}$, í km, UBE_{city}, í Wh.	Ef AER_{city} er fengið úr prófun 1 með því að keyra viðeigandi WLTP-prófunarlotur skal gildið reiknað út í samræmi við lið 4.4.1.2.2 í þessum undirviðauka. Ef um er að ræða fleiri en eina prófun skal $n_{city,pe}$ vera jafnt í hverri prófun. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Meðaltal reiknað fyrir AER_{city}. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	AER_{city}, í km, $AER_{city,ave}$, í km.	7
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3 Frálagsþrep 4	$dj_{,j}$, í km, n_{veh}, $n_{veh,L}$,	Fasatengdur og lotutengdur útreikningur á notkunarstuðlum (e. *usage factor* – UF). Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$UF_{phase,j}$, $UF_{cycle,c}$.	8
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3 Frálagsþrep 4 Frálagsþrep 8	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, $dj_{,j}$, í km, E_{AC}, í Wh, n_{veh}, $n_{veh,L}$, $UF_{phase,j}$,	Útreikningur raforkunotkunar á grundvelli endurhlaðinnar orku samkvæmt liðum 4.3.1 og 4.3.2 í þessum undirviðauka. Nota skal $n_{veh,L}$ lotur ef brúun er beitt. Raforkunotkun í staðfestingar-prófunarlotunni og fösum þeirrar prófunar skal þess vegna vera stillt á núll út af nauðsynlegri leiðréttingu á massalosun koltvísýrings. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{AC,weighted}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD}$, í Wh/km,	9

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3 Frálagsþrep 4 Frálagsþrep 8	$M_{CO2,CD,j}$, í g/km, K_{CO2}, í (g/km)/(Wh/km), $\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, $Dj_{,j}$, í km, n_{veh}, $n_{veh,L}$, $UF_{phase,j}$.	Útreikningur á massalosun koltvísýrings í afhleðsluham í samræmi við lið 4.1.2 í þessum undirviðauka. Nota skal $n_{veh,L}$ lotur ef brúunaraðferðinni er beitt. Með tilvísun í lið 4.1.2 í þessum undirviðauka skal staðfestingarlotan leiðrétt í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$M_{CO2,CD}$, í g/km,	10
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3 Frálagsþrep 4 Frálagsþrep 8	$M_{CO2,CD,j}$, í g/km, $M_{i,CD,j}$, í g/km, K_{CO2}, í (g/km)/(Wh/km). n_{veh}, $n_{veh,L}$, $UF_{phase,j}$,	Útreikningur á eldsneytisnotkun í afhleðslulotu í samræmi við lið 4.2.2 í þessum undirviðauka. Nota skal $n_{veh,L}$ lotur ef brúunaraðferðinni er beitt. Með tilvísun í lið 4.1.2 í þessum undirviðauka skal $M_{CO2,CD,j}$ í staðfestingarlotunni leiðrétt í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka. Reikna skal út fasatengda eldsneytisnotkun $FC_{CD,j}$ með leiðréttri massalosun koltvísýrings í samræmi við 6. lið 7. undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$FC_{CD,j}$, í l/100 km, FC_{CD}, í l/100 km.	11
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, $dj_{,j}$, í km,	Útreikningur raforkunotkunar í fyrstu viðeigandi WLTP-prófunarlotunni. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{DC,CD,first}$, í Wh/km	12
Frálagsþrep 9 Frálagsþrep 10 Frálagsþrep 11 Frálagsþrep 12	$EC_{AC,weighted}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD}$, í g/km, FC_{CD}, í l/100 km, $EC_{DC,CD,first}$, í Wh/km.	Meðaltal prófana fyrir hvert ökutæki. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{AC,weighted,ave}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,ave}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,ave}$, í g/km, $FC_{CD,ave}$, í l/100 km, $EC_{DC,CD,first,ave}$, í Wh/km	13

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 13	$EC_{AC,CD,ave}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,ave}$, í g/km.	Yfirlýsing á raforkunotkun og massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir hvert ökutæki. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunar-aðferðinni er beitt.	$EC_{AC,CD,dec}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,dec}$, í g/km.	14
Frálagsþrep 12 Frálagsþrep 13 Frálagsþrep 14	$EC_{DC,CD,first}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,ave}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,dec}$, í Wh/km,	Aðlögun raforkunotkunar að því er varðar samræmi framleiðslu. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunar-aðferðinni er beitt.	$EC_{DC,CD,COP}$, í Wh/km,	15
Frálagsþrep 15 Frálagsþrep 14 Frálagsþrep 13	$EC_{DC,CD,COP}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,dec}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,dec}$, í g/km, $EC_{AC,weighted,ave}$, í Wh/km, $FC_{CD,ave}$, í l/100 km,	Námundun milligilda. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunar-aðferðinni er beitt.	$EC_{DC,CD,COP,final}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,final}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,final}$, í g/km, $EC_{AC,weighted,final}$, í Wh/km, $FC_{CD,final}$, í l/100 km,	16
Frálagsþrep 16	$EC_{DC,CD,COP,final}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,final}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,final}$, í g/km, $EC_{AC,weighted,final}$, í Wh/km, $FC_{CD,final}$, í l/100 km,	Brúun einstakra gilda á grundvelli ílags frá ökutækjum L, M og H og endanleg námundun. Frálag sem er tiltækt fyrir einstök ökutæki.	$EC_{DC,CD,COP,ind}$, í Wh/km, $EC_{AC,CD,ind}$, í Wh/km, $M_{CO2,CD,ind}$, í g/km, $EC_{AC,weighted,ind}$, í Wh/km, $FC_{CD,ind}$, í l/100 km,	17

4.6.2. Þrepskipt aðferð við útreikning á endanlegum vegnum niðurstöðum hleðsluprófunar og afhleðsluprófunar úr prófun 1.

Reikna skal út niðurstöðurnar í þeirri röð sem lýst er í töflu A8/9. Allar viðeigandi niðurstöður í dálkinum „Frálag“ skulu skráðar. Dálkurinn „Ferli“ tilgreinir þá liði sem nota á fyrir útreikninga eða inniheldur viðbótarútreikninga.

Að því er varðar þessa töflu er eftirfarandi flokkunarkerfi notað innan jafnanna og niðurstaðanna:

c	tímabilið sem um ræðir er heil viðeigandi prófunarlota,
p	tímabilið sem um ræðir er viðeigandi lotufasi,
i	viðeigandi markgildalosunarþáttur (koltvísýringur undanþeginn),
j	skrárnúmer fyrir tímabilið sem um ræðir,
CS	hleðsla,
CD	afhleðsla,
Koltvísýringur (CO_2)	massalosun koltvísýrings,
Endurhlaðanlegt raforkugeymslu-kerfi	endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi.

Tafla A8/9

Útreikningur á endanlegum vegnum gildum í afhleðsluham og hleðsluham

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1 í töflu A8/8	$M_{i,CD,j}$, í g/km, $PN_{CD,j}$, í ögnum á kílómetra, $PM_{CD,c}$, í mg/km, $M_{CO2,CD,j}$, í g/km, $\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, AER, í km, E_{AC}, í Wh,	Ílag frá eftirvinnslu á afhleðsluham og hleðsluham.	$M_{i,CD,j}$, í g/km, $PN_{CD,j}$, í ögnum á kílómetra, $PM_{CD,c}$, í mg/km, $M_{CO2,CD,j}$, í g/km, $\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, AER, í km, E_{AC}, í Wh,	1
Frálagsþrep 7 í töflu A8/8	$AER_{city,ave}$, í km,		$AER_{city,ave}$, í km,	
Frálagsþrep 3 í töflu A8/8	n_{veh}, R_{CDC}, í km,		n_{veh}, R_{CDC}, í km,	
Frálagsþrep 4 í töflu A8/8	$n_{veh,L}$, $n_{veh,H}$,		$n_{veh,L}$, $n_{veh,H}$,	
Frálagsþrep 8 í töflu A8/8	$UF_{phase,j}$, $UF_{cycle,c}$,		$UF_{phase,j}$, $UF_{cycle,c}$,	
Frálagsþrep 6 í töflu A8/5	$M_{i,CS,c,6}$, í g/km,		$M_{i,CS,c,6}$, í g/km,	
Frálagsþrep 7 í töflu A8/5	$M_{CO2,CS}$, í g/km,		$M_{CO2,CS}$, í g/km,	
		Ef um er að ræða afhleðslu er frálag tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Ef um er að ræða hleðslu er frálag tiltækt í eitt skipti vegna meðaltals gilda úr hleðsluprófun. Frálagið (að frátöldu K_{CO2}) er tiltækt fyrir ökutæki H, L og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.		
	K_{CO2}, (g/km)/(Wh/km).	Leiðréttingarstuðull fyrir massalosun koltvísýrings K_{CO2} getur verið nauðsynlegur í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka.	K_{CO2}, (g/km)/(Wh/km).	
Frálagsþrep 1	$M_{i,CD,j}$, í g/km, $PN_{CD,j}$, í ögnum á kílómetra, $PM_{CD,c}$, í mg/km, n_{veh}, $n_{veh,L}$, $UF_{phase,j}$, $UF_{cycle,c}$, $M_{i,CS,c,6}$, í g/km,	Útreikningur á veginni losun efnasambanda (að frátöldu $M_{CO2,weighted}$) í samræmi við liði 4.1.3.1 til 4.1.3.3 í þessum undirviðauka. Athugasemd: $M_{i,CS,c,6}$ inniheldur $PN_{CS,c}$ og $PM_{CS,c}$. Frálag er tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$M_{i,weighted}$, í g/km, $PN_{weighted}$, í ögnum á kílómetra, $PM_{weighted}$, í mg/km,	2

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1	$M_{CO2,CD,j}$, í g/km, $\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, n_{veh}, R_{CDC}, í km $M_{CO2,CS}$, í g/km,	Útreikningur á jafngildri fullri rafdrægni (EAER) í samræmi við liði 4.4.4.1 og 4.4.4.2 í þessum undirviðauka og raundrægni í afhleðsluham í samræmi við lið 4.4.5 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	EAER, í km, $EAER_p$, í km, R_{CDA}, í km.	3
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3	AER, í km, R_{CDA}, í km.	Frálag er tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Ef brúunaraðferðinni er beitt skal athuga tiltækileika brúunar fyrir fulla rafdrægni milli ökutækja H, L og, ef við á, M í samræmi við lið 4.5.7.1 í þessum undirviðauka. Hver prófun skal uppfylla kröfuna ef brúunaraðferðinni er beitt.	Tiltækileiki brúunar fyrir fulla rafdrægni.	4
Frálagsþrep 1	AER, í km.	Meðaltal af fullri rafdrægni og yfirlýsing um fulla rafdrægni. Námunda skal gildi fyrir yfirlýsta fulla rafdrægni eins og skilgreint er í töflu A6/1. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt og viðmiðunin um tiltækileika brúunaraðferðar fyrir fulla rafdrægni er uppfyllt. Ef viðmiðunin er ekki uppfyllt skal full rafdrægni ökutækis H notuð fyrir allan brúunarhópinn.	AER_{ave}, í km, AER_{dec}, í km.	5
Frálagsþrep 1	$M_{i,CD,j}$, í g/km, $M_{CO2,CD,j}$, í g/km, n_{veh}, $n_{veh,L}$, $UF_{phase,j}$, $M_{i,CS,c,6}$, í g/km, $M_{CO2,CS}$, í g/km.	Útreikningur á veginni massalosun koltvísýrings og eldsneytisnotkunar í samræmi við liði 4.1.3.1 og 4.2.3 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Nota skal $n_{veh,L}$ lotur ef brúunaraðferðinni er beitt. Með tilvísun í lið 4.1.2 í þessum undirviðauka skal $M_{CO2,CD,j}$ í staðfestingarlotunni leiðrétt í samræmi við 2. viðbæti við þennan undirviðauka. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$M_{CO2,weighted}$, í g/km, $FC_{weighted}$, í l/100 km,	6

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3	E_{AC}, í Wh, EAER, í km, $EAER_p$, í km,	Útreikningur á raforkunotkun á grundvelli jafngildis fullrar rafdrægni í samræmi við liði 4.3.3.1 og 4.3.3.2 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja afhleðsluprófun. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	EC, í Wh/km, EC_p, í Wh/km,	7
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 6 Frálagsþrep 7 Frálagsþrep 3	$AER_{city,\ ave}$, í km, $M_{CO2,weighted}$, í g/km, $FC_{weighted}$, í l/100 km, EC, í Wh/km, EC_p, í Wh/km, EAER, í km, $EAER_p$, í km.	Meðaltal og námundun milligilda. Frálagið er tiltækt fyrir hvert ökutæki L, H og, ef við á, ökutæki M ef brúunaraðferðinni er beitt.	$AER_{city,final}$, í km, $M_{CO2,weighted,final}$, í g/km, $FC_{weighted,final}$, í l/100 km, EC_{final}, í Wh/km, $EC_{p,final}$, í Wh/km, $EAER_{final}$, í km, $EAER_{p,final}$, í km.	8
Frálagsþrep 5 Frálagsþrep 8 Frálagsþrep 4	AER_{ave}, í km, $AER_{city,final}$, í km, $M_{CO2,weighted,final}$, í g/km, $FC_{weighted,final}$, í l/100 km, EC_{final}, í Wh/km, $EC_{p,final}$, í Wh/km, $EAER_{final}$, í km, $EAER_{p,final}$, í km, Tiltækileiki brúunar fyrir fulla rafdrægni.	Brúun einstakra gilda á grundvelli ílags úr ökutækjum L, M og H í samræmi við lið 4.5 í þessum undirviðauka, ásamt endanlegri námundun. Námunda skal gildi fyrir AER_{ind} eins og skilgreint er í töflu A8/2. Frálag sem er tiltækt fyrir einstök ökutæki.	AER_{ind}, í km, $AER_{city,ind}$, í km, $M_{CO2,weighted,ind}$, í g/km, $FC_{weighted,ind}$, í l/100 km, EC_{ind}, í Wh/km, $EC_{p,ind}$, í Wh/km, $EAER_{ind}$, í km, $EAER_{p,ind}$, í km.	9

4.7. Þrepskipt aðferð til að reikna út endanlegar niðurstöður úr prófunum á tvinnrafökutækjum

Reikna skal út niðurstöðurnar í þeirri röð sem lýst er í töflu A8/10 ef um er að ræða samfelldar lotur og í þeirri röð sem lýst er í töflu A8/11 ef um er að ræða stytta prófunaraðferð. Allar viðeigandi niðurstöður í dálkinum „Frálag“ skulu skráðar. Dálkurinn „Ferli“ tilgreinir þá liði sem nota á fyrir útreikninga eða inniheldur viðbótarútreikninga.

4.7.1. Þrepskipt aðferð til að reikna út endanlegar niðurstöður úr prófunum á tvinnrafökutækjum ef um er að ræða samfelldar lotur

Að því er varðar þessa töflu er eftirfarandi flokkunarkerfi notað innan jafnanna og niðurstaðanna:

j skrárnúmer fyrir tímabilið sem um ræðir.

Tafla A8/10

Útreikningur á endanlegum gildum fyrir tvinnrafökutæki sem eru ákvörðuð með því að beita prófun 1 með samfelldri lotu

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
8. undirviðauki	Niðurstöður úr prófun	Niðurstöður eru mældar í samræmi við 3. viðbæti við þennan undirviðauka og reiknaðar út fyrir fram í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka. Nothæf orka í rafgeymi í samræmi við lið 4.4.2.2.1 í þessum undirviðauka. Endurhlaðin raforka í samræmi við lið 3.4.4.3 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, UBE_{CCP}, í Wh, E_{AC}, í Wh.	1
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, UBE_{CCP}, í Wh.	Ákvörðun á fjölda af heilum keyrðum viðeigandi fösum og lotum í WLTC-prófun í samræmi við lið 4.4.2.2 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	n_{WLTC}, n_{city}, n_{low}, n_{med}, n_{high}, n_{exHigh}.	2
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 2	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, UBE_{CCP}, í Wh. n_{WLTC}, n_{city}, n_{low}, n_{med}, n_{high}, n_{exHigh}.	Útreikningur á vægisstuðlum í samræmi við lið 4.4.2.2 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$K_{WLTC,1}$ $K_{WLTC,2}$ $K_{WLTC,3}$ $K_{WLTC,4}$ $K_{city,1}$ $K_{city,2}$ $K_{city,3}$ $K_{city,4}$ $K_{low,1}$ $K_{low,2}$ $K_{low,3}$ $K_{low,4}$ $K_{med,1}$ $K_{med,2}$ $K_{med,3}$ $K_{med,4}$ $K_{high,1}$ $K_{high,2}$ $K_{high,3}$ $K_{high,4}$ $K_{exHigh,1}$ $K_{exHigh,2}$ $K_{exHigh,3}$	3

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, UBE_{CCP}, í Wh.	Útreikningur á raforkunotkun í endurhlaðanlegum raforkugeymslukerfum í samræmi við lið 4.4.2.2 í þessum undirviðauka. $EC_{DC,COP,1}$ Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{DC,WLTC}$, í Wh/km, $EC_{DC,city}$, í Wh/km, $EC_{DC,low}$, í Wh/km, $EC_{DC,med}$, í Wh/km, $EC_{DC,high}$, í Wh/km, $EC_{DC,exHigh}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,1}$, í Wh/km.	4
Frálagsþrep 2	n_{WLTC}, n_{city}, n_{low}, n_{med}, n_{high}, n_{exHigh}.			
Frálagsþrep 3	Allir vægisstuðlar			
Frálagsþrep 1	UBE_{CCP}, í Wh,	Útreikningur á hreinni rafdrægni í samræmi við lið 4.4.2.2 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km.	5
Frálagsþrep 4	$EC_{DC,WLTC}$, í Wh/km, $EC_{DC,city}$, í Wh/km, $EC_{DC,low}$, í Wh/km, $EC_{DC,med}$, í Wh/km, $EC_{DC,high}$, í Wh/km, $EC_{DC,exHigh}$, í Wh/km.			
Frálagsþrep 1	E_{AC}, í Wh,	Útreikningur á raforkunotkun frá rafveitu í samræmi við lið 4.3.4 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	EC_{WLTC}, í Wh/km, EC_{city}, í Wh/km, EC_{low}, í Wh/km, EC_{med}, í Wh/km, EC_{high}, í Wh/km, EC_{exHigh}, í Wh/km.	6
Frálagsþrep 5	PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km.			
Frálagsþrep 5	PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km,	Meðaltal prófana fyrir öll ílagsgildi. $EC_{DC,COP,ave}$ Yfirlýsing um $PER_{WLTC,dec}$ og $EC_{WLTC,dec}$ á grundvelli $PER_{WLTC,ave}$ og $EC_{WLTC,ave}$. Námunda skal gildi fyrir $PER_{WLTC,dec}$ og $EC_{WLTC,dec}$ eins og skilgreint er í töflu A6/1. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$PER_{WLTC,dec}$, í km, $PER_{WLTC,ave}$, í km, $PER_{city,ave}$, í km, $PER_{low,ave}$, í km, $PER_{med,ave}$, í km, $PER_{high,ave}$, í km, $PER_{exHigh,ave}$, í km,	7
Frálagsþrep 6	EC_{WLTC}, í Wh/km, EC_{city}, í Wh/km, EC_{low}, í Wh/km, EC_{med}, í Wh/km, EC_{high}, í Wh/km, EC_{exHigh}, í Wh/km.		$EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $EC_{WLTC,ave}$, í Wh/km, $EC_{city,ave}$, í Wh/km, $EC_{low,ave}$, í Wh/km, $EC_{med,ave}$, í Wh/km, $EC_{high,ave}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ave}$, í Wh/km,	
Frálagsþrep 4	$EC_{DC,COP,1}$, í Wh/km.		$EC_{DC,COP,ave}$, í Wh/km.	

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 7	$EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $EC_{WLTC,ave}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,ave}$, í Wh/km.	Ákvörðun á leiðréttingarstuðli og notkun á $EC_{DC,COP,ave}$. Til dæmis: $AF = \frac{EC_{WLTC,dec}}{EC_{WLTC,ave}}$ $EC_{DC,COP} = EC_{DC,COP,ave} \times AF$ Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{DC,COP}$, í Wh/km.	8
Frálagsþrep 7	$PER_{city,ave}$, í km, $PER_{low,ave}$, í km, $PER_{med,ave}$, í km, $PER_{high,ave}$, í km, $PER_{exHigh,ave}$, í km, $EC_{city,ave}$, í Wh/km, $EC_{low,ave}$, í Wh/km, $EC_{med,ave}$, í Wh/km, $EC_{high,ave}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ave}$, í Wh/km, Frálagsþrep 8 $EC_{DC,COP}$, í Wh/km.	Námundun milligilda. $EC_{DC,COP,final}$ Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki H og L ef brúunaraðferðinni er beitt.	$PER_{city,final}$, í km, $PER_{low,final}$, í km, $PER_{med,final}$, í km, $PER_{high,final}$, í km, $PER_{exHigh,final}$, í km, $EC_{city,final}$, í Wh/km, $EC_{low,final}$, í Wh/km, $EC_{med,final}$, í Wh/km, $EC_{high,final}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,final}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,final}$, í Wh/km.	9
Frálagsþrep 7 Frálagsþrep 9	$PER_{WLTC,dec}$, í km, $EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $PER_{city,final}$, í km, $PER_{low,final}$, í km, $PER_{med,final}$, í km, $PER_{high,final}$, í km, $PER_{exHigh,final}$, í km, $EC_{city,final}$, í Wh/km, $EC_{low,final}$, í Wh/km, $EC_{med,final}$, í Wh/km, $EC_{high,final}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,final}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,final}$, í Wh/km.	Brúun í samræmi við lið 4.5 í þessum undirviðauka og endanleg námundun eins og skilgreint er í töflu A8/2. $EC_{DC,COP,ind}$ Frálagið er tiltækt fyrir hvert einstakt ökutæki ef brúunaraðferðinni er beitt.	$PER_{WLTC,ind}$, í km, $PER_{city,ind}$, í km, $PER_{low,ind}$, í km, $PER_{med,ind}$, í km, $PER_{high,ind}$, í km, $PER_{exHigh,ind}$, í km, $EC_{WLTC,ind}$, í Wh/km, $EC_{city,ind}$, í Wh/km, $EC_{low,ind}$, í Wh/km, $EC_{med,ind}$, í Wh/km, $EC_{high,ind}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ind}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,ind}$, í Wh/km.	10

4.7.2. Þrepskipt aðferð til að reikna út endanlegar niðurstöður úr prófunum á tvinnrafökutækjum ef um er að ræða stytta prófunaraðferð

Að því er varðar þessa töflu er eftirfarandi flokkunarkerfi notað innan jafnanna og niðurstaðanna:

j skrárnúmer fyrir tímabilið sem um ræðir.

Tafla A8/11

Útreikningur á endanlegum gildum fyrir tvinnrafökutæki sem eru ákvörðuð með því að beita styttri prófun 1

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
8. undirviðauki	Niðurstöður úr prófun	Niðurstöður eru mældar í samræmi við 3. viðbæti við þennan undirviðauka og reiknaðar út fyrir fram í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka. Nothæf orka í rafgeymi í samræmi við lið 4.4.2.1.1 í þessum undirviðauka. Endurhlaðin raforka í samræmi við lið 3.4.4.3 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, UBE_{STP}, í Wh, E_{AC}, í Wh.	1
Frálagsþrep 1	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, UBE_{STP}, í Wh.	Útreikningur á vægisstuðlum í samræmi við lið 4.4.2.1 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$K_{WLTC,1}$ $K_{WLTC,2}$ $K_{city,1}$ $K_{city,2}$ $K_{city,3}$ $K_{city,4}$ $K_{low,1}$ $K_{low,2}$ $K_{low,3}$ $K_{low,4}$ $K_{med,1}$ $K_{med,2}$ $K_{med,3}$ $K_{med,4}$ $K_{high,1}$ $K_{high,2}$ $K_{exHigh,1}$ $K_{exHigh,2}$	2
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 2	$\Delta E_{REESS,j}$, í Wh, dj_j, í km, UBE_{STP}, í Wh. Allir vægisstuðlar	Útreikningur á raforkunotkun í endurhlaðanlegum raforkugeymslukerfum í samræmi við lið 4.4.2.1 í þessum undirviðauka. $EC_{DC,COP,1}$ Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{DC,WLTC}$, í Wh/km, $EC_{DC,city}$, í Wh/km, $EC_{DC,low}$, í Wh/km, $EC_{DC,\ med}$, í Wh/km, $EC_{DC,high}$, í Wh/km, $EC_{DC,exHigh}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,1}$, í Wh/km.	3

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 3	UBE_{STP}, í Wh, $EC_{DC,WLTC}$, í Wh/km, $EC_{DC,city}$, í Wh/km, $EC_{DC,low}$, í Wh/km, $EC_{DC,\ med}$, í Wh/km, $EC_{DC,high}$, í Wh/km, $EC_{DC,exHigh}$, í Wh/km.	Útreikningur á hreinni rafdrægni í samræmi við lið 4.4.2.1 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km.	4
Frálagsþrep 1 Frálagsþrep 4	E_{AC}, í Wh, PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km.	Útreikningur á raforkunotkun frá rafveitu í samræmi við lið 4.3.4 í þessum undirviðauka. Frálag er tiltækt fyrir hverja prófun. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	EC_{WLTC}, í Wh/km, EC_{city}, í Wh/km, EC_{low}, í Wh/km, EC_{med}, í Wh/km, EC_{high}, í Wh/km, EC_{exHigh}, í Wh/km.	5
Frálagsþrep 4 Frálagsþrep 5 Frálagsþrep 3	PER_{WLTC}, í km, PER_{city}, í km, PER_{low}, í km, PER_{med}, í km, PER_{high}, í km, PER_{exHigh}, í km, EC_{WLTC}, í Wh/km, EC_{city}, í Wh/km, EC_{low}, í Wh/km, EC_{med}, í Wh/km, EC_{high}, í Wh/km, EC_{exHigh}, í Wh/km. $EC_{DC,COP,1}$, í Wh/km.	Meðaltal prófana fyrir öll ílagsgildi. $EC_{DC,COP,ave}$ Yfirlýsing um $PER_{WLTC,dec}$ og $EC_{WLTC,dec}$ á grundvelli $PER_{WLTC,ave}$ og $EC_{WLTC,ave}$. Námunda skal gildi fyrir $PER_{WLTC,dec}$ og $EC_{WLTC,dec}$ eins og skilgreint er í töflu A6/1. Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$PER_{WLTC,dec}$, í km, $PER_{WLTC,ave}$, í km, $PER_{city,ave}$, í km, $PER_{low,ave}$, í km, $PER_{med,ave}$, í km, $PER_{high,ave}$, í km, $PER_{exHigh,ave}$, í km, $EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $EC_{WLTC,ave}$, í Wh/km, $EC_{city,ave}$, í Wh/km, $EC_{low,ave}$, í Wh/km, $EC_{med,ave}$, í Wh/km, $EC_{high,ave}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ave}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,ave}$, í Wh/km.	6
Frálagsþrep 6	$EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $EC_{WLTC,ave}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,ave}$, í Wh/km.	Ákvörðun á leiðréttingarstuðli og notkun á $EC_{DC,COP,ave}$. Til dæmis: $$AF = \frac{EC_{WLTC,dec}}{EC_{WLTC,ave}}$$ $EC_{DC,COP} = EC_{DC,COP,ave} \times AF$ Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$EC_{DC,COP}$, í Wh/km.	7

Uppruni	Ílag	Ferli	Frálag	Þrep nr.
Frálagsþrep 6	$PER_{city,ave}$, í km, $PER_{low,ave}$, í km, $PER_{med,ave}$, í km, $PER_{high,ave}$, í km, $PER_{exHigh,ave}$, í km, $EC_{city,ave}$, í Wh/km, $EC_{low,ave}$, í Wh/km, $EC_{med,ave}$, í Wh/km, $EC_{high,ave}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ave}$, í Wh/km,	Námundun milligilda. $EC_{DC,COP,final}$ Frálagið er tiltækt fyrir ökutæki L og H ef brúunaraðferðinni er beitt.	$PER_{city,final}$, í km, $PER_{low,final}$, í km, $PER_{med,final}$, í km, $PER_{high,final}$, í km, $PER_{exHigh,final}$, í km, $EC_{city,final}$, í Wh/km, $EC_{low,final}$, í Wh/km, $EC_{med,final}$, í Wh/km, $EC_{high,final}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,final}$, í Wh/km,	8
Frálagsþrep 7	$EC_{DC,COP}$, í Wh/km.		$EC_{DC,COP,final}$, í Wh/km.	
Frálagsþrep 6	$PER_{WLTC,dec}$, í km, $EC_{WLTC,dec}$, í Wh/km, $PER_{city,final}$, í km, $PER_{low,final}$, í km, $PER_{med,final}$, í km, $PER_{high,final}$, í km, $PER_{exHigh,final}$, í km,	Brúun í samræmi við lið 4.5 í þessum undirviðauka og endanleg námundun eins og skilgreint er í töflu A8/2. $EC_{DC,COP,ind}$ Frálag sem er tiltækt fyrir hvert einstakt ökutæki.	$PER_{WLTC,ind}$, í km, $PER_{city,ind}$, í km, $PER_{low,ind}$, í km, $PER_{med,ind}$, í km, $PER_{high,ind}$, í km, $PER_{exHigh,ind}$, í km,	9“
Frálagsþrep 8	$EC_{city,final}$, í Wh/km, $EC_{low,final}$, í Wh/km, $EC_{med,final}$, í Wh/km, $EC_{high,final}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,final}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,final}$, í Wh/km.		$EC_{WLTC,ind}$, í Wh/km, $EC_{city,ind}$, í Wh/km, $EC_{low,ind}$, í Wh/km, $EC_{med,ind}$, í Wh/km, $EC_{high,ind}$, í Wh/km, $EC_{exHigh,ind}$, í Wh/km, $EC_{DC,COP,ind}$, í Wh/km.	

av) Ákvæðum 1. viðbætis er breytt sem hér segir:

i. Í stað liðar 1.4 og fyrirsagnar við mynd A8.viðb.1/4 kemur eftirfarandi:

„1.4. Prófunarröð fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu í samræmi við valkost 4:

Hleðsluprófun 1 með síðari afhleðsluprófun 1 (mynd A8.viðb.1/4)

Mynd A8.App1/4

Hleðsluprófun 1 með síðari afhleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu“.

aw) Ákvæðum 2. viðbætis er breytt sem hér segir:

i. í stað liða 1.1.3 og 1.1.4 kemur eftirfarandi:

„1.1.3. Beita skal leiðréttingunni ef $\Delta E_{REESS,CS}$ er neikvætt sem samsvarar afhleðslu endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins og leiðréttingarviðmiðun c, sem er reiknuð út í lið 1.2 í þessum viðbæti, er hærri en gildandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A8.viðb.2/1.

1.1.4. Sleppa má leiðréttingu og nota má óleiðrétt gildi ef:

a) $\Delta E_{REESS,CS}$ er jákvætt sem samsvarar hleðslu endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins og leiðréttingarviðmiðun c, sem er reiknuð út í lið 1.2 í þessum viðbæti, er hærri en gildandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A8.viðb.2/1,

b) leiðréttingarviðmiðun c sem er reiknuð út í lið 1.2 í þessum viðbæti er minni en viðeigandi viðmiðunarmörk í samræmi við töflu A8.viðb.2/1,

c) framleiðandinn getur sannað fyrir viðurkenningaryfirvaldinu með mælingu að það sé engin tenging milli $\Delta b_{REESS,CS}$ og massalosunar koltvísýrings í hleðsluham annars vegar og $\Delta m_{REESS,CS}$ og eldsneytisnotkunar hins vegar.“

ii. Í stað skilgreiningarinnar á $E_{fuel,CS}$ í lið 1.2 kemur eftirfarandi:

„$E_{fuel,CS}$ er orkuinnihald í notuðu eldsneyti í hleðsluham í samræmi við lið 1.2.1 í þessum viðbæti ef um er að ræða tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki, sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu og í samræmi við lið 1.2.2 í þessum viðbæti ef um er að ræða tvinnökutæki með efnarafala, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, í Wh.“

iii. Í stað töflu A8.viðb.2/1 í lið 1.2.2 kemur eftirfarandi:

„*Tafla A8.App2/1*

Viðmiðunarmörk leiðréttingar fyrir hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis (RCB)

Viðeigandi prófunarlota fyrir prófun 1	Lág + meðal	Lág + meðal + há	Lág + meðal + há + mjög há
Viðmiðunarmörk fyrir leiðréttingar-viðmiðun c	0,015	0,01	0,005“

iv. Í stað a-liðar í lið 2.2 kemur eftirfarandi:

„a) Þetta sett skal fela í sér a.m.k. eina prófun með $\Delta E_{REESS,CS,n} \leq 0$ og a.m.k. eina prófun með $\Delta E_{REESS,CS,n} > 0$. $\Delta E_{REESS,CS,n}$, er summa af raforkubreytingum allra endurhlaðanlegra raforkugeymslukerfa í prófun n reiknuð út í samræmi við lið 4.3 í þessum undirviðauka.“

v. Í stað e-liðar liðar 2.2 og síðustu tveggja málsgreinanna kemur eftirfarandi:

„e) Munurinn á $M_{CO2,CS}$ milli prófunar með mestri neikvæðri raforkubreytingu og miðpunkts, og munurinn á $M_{CO2,CS}$ milli miðpunkts og prófunar með mestri jákvæðri raforkubreytingu skal vera svipaður. Miðpunkturinn ætti helst að vera innan sviðsins sem skilgreint er í d-lið. Viðurkenningaryfirvaldið skal ákveða hvort endurprófun sé nauðsynleg ef ekki er mögulegt að fylgja þessari kröfu.

Leiðréttingarstuðlar sem framleiðandi ákvarðar skulu rýndir og samþykktir af viðurkenningaryfirvaldi áður en þeim er beitt.

Ef sett af a.m.k. fimm prófunum uppfyllir ekki viðmiðunina í a-lið eða viðmiðunina í b-lið eða uppfyllir hvoruga þeirra skal framleiðandi leggja fyrir viðurkenningaryfirvaldið sönnunargögn um hvers vegna ökutækið geti ekki uppfyllt aðra hvora eða hvoruga viðmiðunina. Viðurkenningaryfirvaldið getur krafist þess að frekari prófanir séu framkvæmdar ef það telur sönnunargögnin ekki fullnægjandi. Viðurkenningaryfirvaldið skal ákvarða varfærnislegan leiðréttingarstuðul byggðan á mælingunum ef viðmiðanir eru enn ekki uppfylltar eftir viðbótarprófanir.“

vi. Í stað liðar 3.1.1.2 kemur eftirfarandi:

„3.1.1.2. Stilling endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis

Framleiðanda er heimilt að stilla endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið fyrir prófunaraðferðina í samræmi við lið 3.1.1.3 í þessum viðbæti. Framleiðandi skal leggja fram sönnunargögn um að kröfur um upphaf prófunar í samræmi við lið 3.1.1.3 í þessum viðbæti séu uppfylltar.“

ax) Ákvæðum 3. viðbætis er breytt sem hér segir:

i. Í lið 2.1.1 bætist eftirfarandi annar undirliður við:

„Framkvæma skal núllstillingu og afseglun á undan prófuninni í samræmi við fyrirmæli framleiðanda tækisins í því skyni að fá nákvæma mælingu.“

ii. Í stað liðar 3.2 kemur eftirfarandi:

„3.2. Nafnspenna í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi

Fyrir tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu, tvinnökutæki með efnarafala, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu má nota nafnspennu í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi sem er ákvörðuð í samræmi við IEC 60050-482 í stað þess að nota mælda spennu í endurhlaðanlegu raforkugeymslukerfi í samræmi við lið 3.1 í þessum viðbæti.“

ay) Ákvæðum 4. viðbætis er breytt sem hér segir:

i. Í stað síðustu málsgreinarinnar í lið 2.1.2 kemur eftirfarandi:

„Í þessu tilviki skal beita formeðhöndlunaraðferð, svo sem þeirri sem er viðeigandi fyrir hrein brunahreyfilsökutæki eins og lýst er í lið 2.6 í 6. undirviðauka.“

ii. Í stað liðar 2.1.3 kemur eftirfarandi:

„2.1.3. Varmajafnvægi ökutækis skal komið á samkvæmt lið 2.7 í 6. undirviðauka.“

iii. Í stað liðar 2.2.2 kemur eftirfarandi:

„2.2.2. Varmajafnvægi ökutækis skal komið á samkvæmt lið 2.7 í 6. undirviðauka. Ekki skal beita þvingaðri kælingu á ökutæki sem eru formeðhöndluð fyrir prófun 1. Meðan varmajafnvægi er að komast á skal endurhlaðanlega raforkugeymslukerfið hlaðið með hefðbundinni hleðsluaðferð eins og er skilgreint í lið 2.2.3 í þessum viðbæti.“

iv. Í stað inngangshlutans í fyrstu málsgrein liðar 2.2.3.1 kemur eftirfarandi:

„Endurhlaðanlegt raforkugeymslukerfi skal hlaðið við umhverfishita eins og tilgreint er í lið 2.2.2.2 í 6. undirviðauka, annaðhvort með:“

az) Í stað 5. viðbætis kemur eftirfarandi:

„8. undirviðauki – 5. viðbætir

Nýtingarstuðlar (e. *utility factor* – UF) fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu

1. Frátekið til notkunar síðar.

2. Aðferðafræðin sem mælt er með við ákvörðun á ferli nýtingarstuðuls á grundvelli tölfræðilegra upplýsinga um akstur eins og lýst er í SAE J2841 (september 2010, gefið út í mars 2009, endurskoðað í september 2010).

3. Við útreikning á broti nýtingarstuðuls UF_j vegna vægis fyrir tímabil j skal beita eftirfarandi jöfnu og nota stuðlana úr töflu A8.viðb.5/1.

$$UF_j(d_j) = 1 - \exp\left\{-\left(\sum_{i=1}^{k} C_i \times \left(\frac{d_j}{d_n}\right)^i\right)\right\} - \sum_{l=1}^{j-1} UF_l$$

þar sem:

UF_j nýtingarstuðull fyrir tímabil j,

d_j mæld vegalengd sem hefur verið ekin við lokin á tímabili j, í km,

C_i i-undi stuðull (sjá töflu A8.viðb.5/1),

d_n stöðluð vegalengd (sjá töflu A8.viðb.5/1), í km,

k fjöldi liða og stuðla í veldisvísinum,

j fjöldi tímabila sem um ræðir,

i fjöldi liða/stuðla sem um ræðir,

$\sum_{l=1}^{j-1} UUF_l$ summa útreiknaðra nýtingarstuðla fram að tímabili (j – 1).

Tafla A8.App5/1

Mæliþættir fyrir ákvörðun á broti nýtingarstuðla

Mæliþáttur	Gildi
d_n	800 km
C1	26,25
C2	–38,94
C3	–631,05
C4	5 964,83
C5	–25 095
C6	60 380,2
C7	–87 517
C8	75 513,8
C9	–35 749
C10	7 154,94“.

ba) Ákvæðum 6. viðbætis er breytt sem hér segir:

i) Í stað liða 1.1, 1.2 og 1.3 kemur eftirfarandi:

„1.1. Framleiðandi skal velja valkvæðan notkunarham fyrir prófunaraðferð 1 í samræmi við 2. til 4. lið í þessum viðbæti sem gerir ökutækinu kleift að fylgja prófunarlotunni sem um ræðir innan vikmarka hraðaferils í samræmi við lið 2.6.8.3 í 6. undirviðauka. Þetta skal gilda um öll kerfi í ökutækjum sem hafa valkvæða notkunarhami, þ.m.t. þau sem eiga ekki einvörðungu við um gírskiptinguna.

1.2. Framleiðandi skal leggja fyrir viðurkenningaryfirvald sönnunargögn um:

a) Tiltækileika aðalhams að uppfylltum þeim skilyrðum sem um ræðir,

b) hámarkshraða ökutækisins sem um ræðir,

og ef þess er krafist:

c) besta og versta ham eins og þeir eru ákvarðaðir út frá gögnum um eldsneytisnotkun og, ef við á, um massalosun koltvísýrings í öllum hömum. Sjá lið 2.6.6.3 í 6. undirviðauka,

d) þann ham sem notar mesta raforku,

e) orkuþörf í lotu (í samræmi við 5. lið 7. undirviðauka þar sem í stað markhraða kemur raunhraði).

1.3. Ekki skal taka tillit til sérstakra valkvæðra notkunarhama eins og „fjallahams“ eða „viðhaldshams“ sem eru ekki ætlaðir fyrir venjulega daglega notkun heldur einungis í sérstökum takmörkuðum tilgang.“

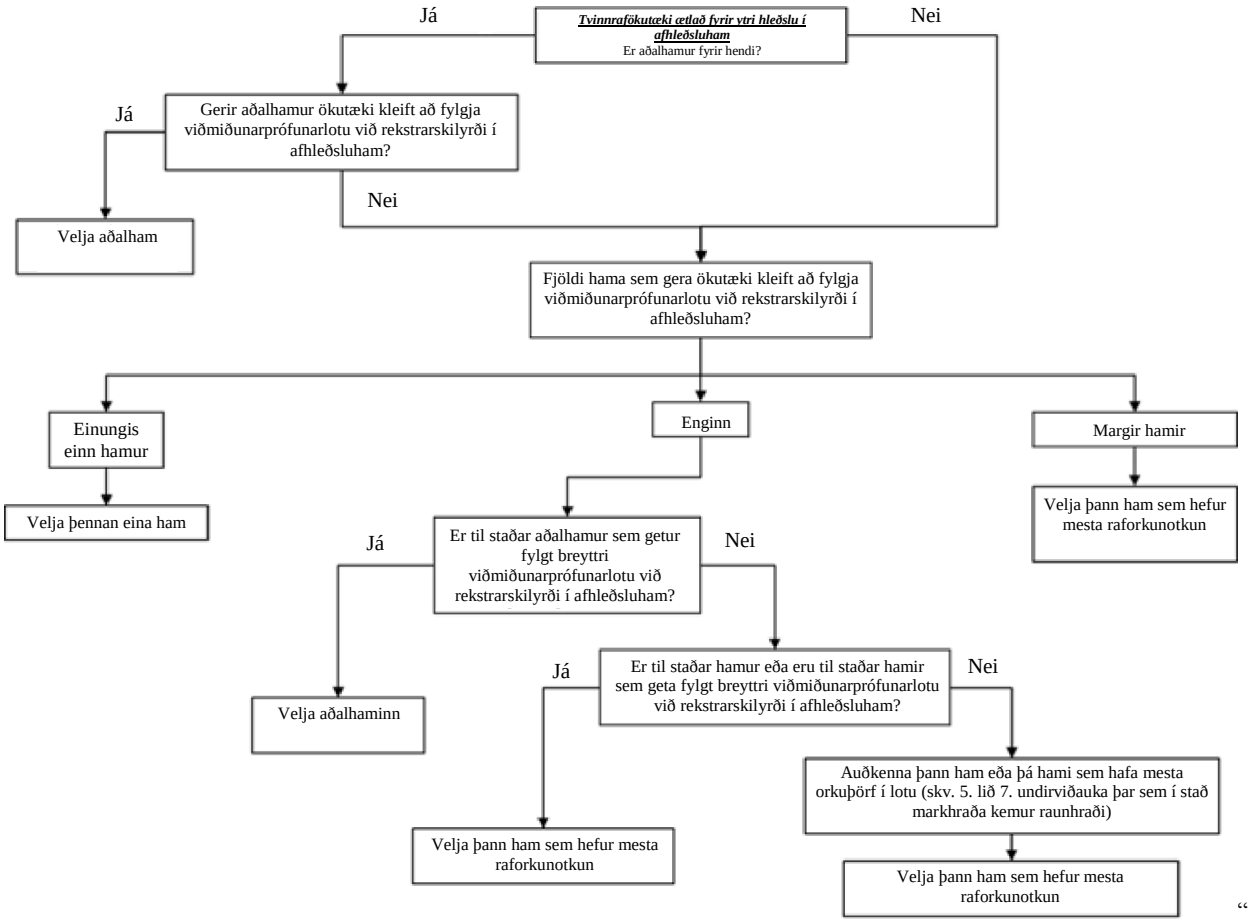
ii. Í stað síðustu málsgreinar í 2. lið kemur eftirfarandi:

„Flæðiritið á mynd A8/viðb.6/1 sýnir valið á ham í samræmi við þennan lið.“

iii. Í stað myndar A8.viðb.6/1 í lið 2.3 kemur eftirfarandi:

„*Mynd A8.viðb.6/1*

Valkvæður notkunarhamur valinn fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu við rekstrarskilyrði í afhleðsluham



“

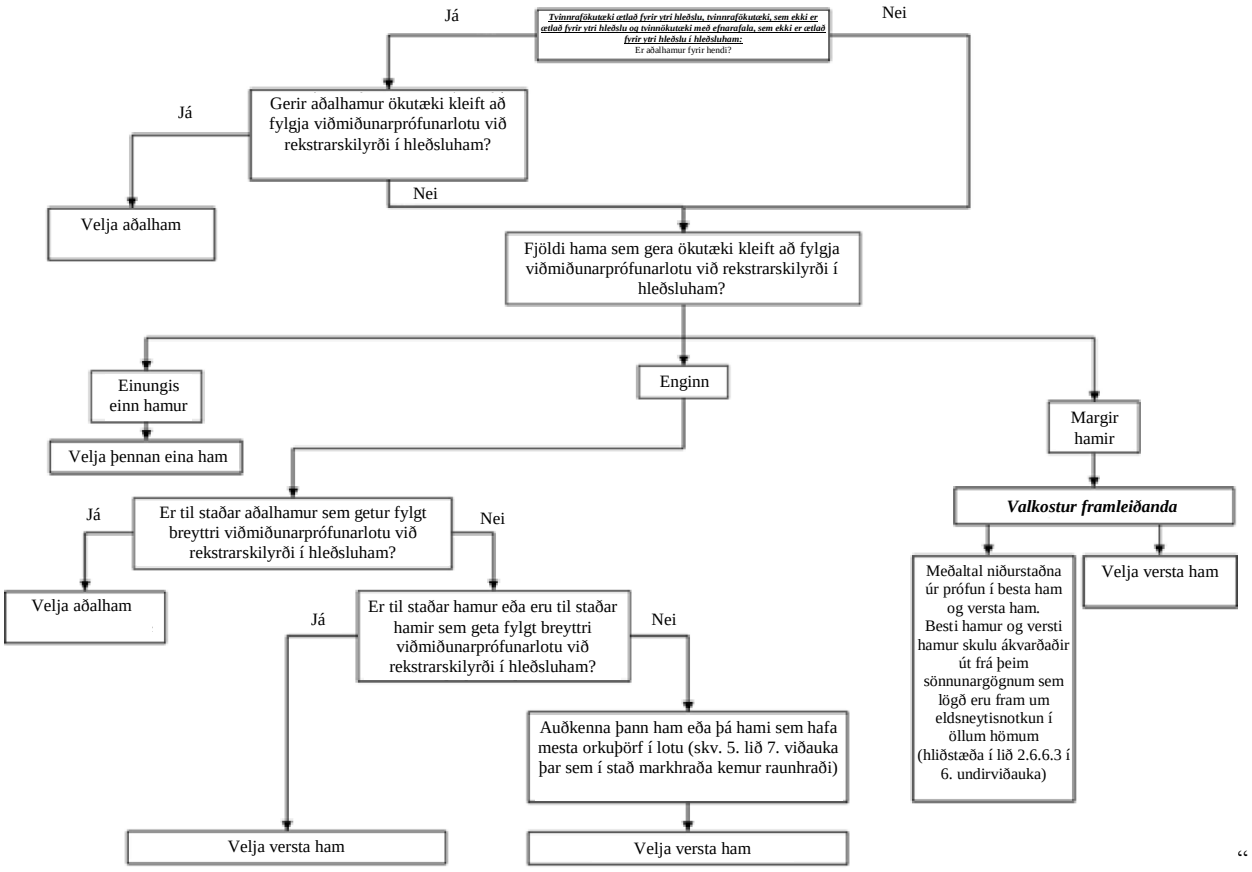
iv. Í stað síðustu málsgreinar í 3. lið kemur eftirfarandi:

„Flæðiritið á mynd A8/viðb.6/2 sýnir valið á ham í samræmi við þennan lið.“

v. Í stað myndar A8.viðb.6/2 í lið 3.3 kemur eftirfarandi:

„*Mynd A8.viðb.6/2*

Valkvæður notkunarhamur valinn fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu, tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu og tvinnökutæki með efnarafala, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu við rekstrarskilyrði í hleðsluham



“

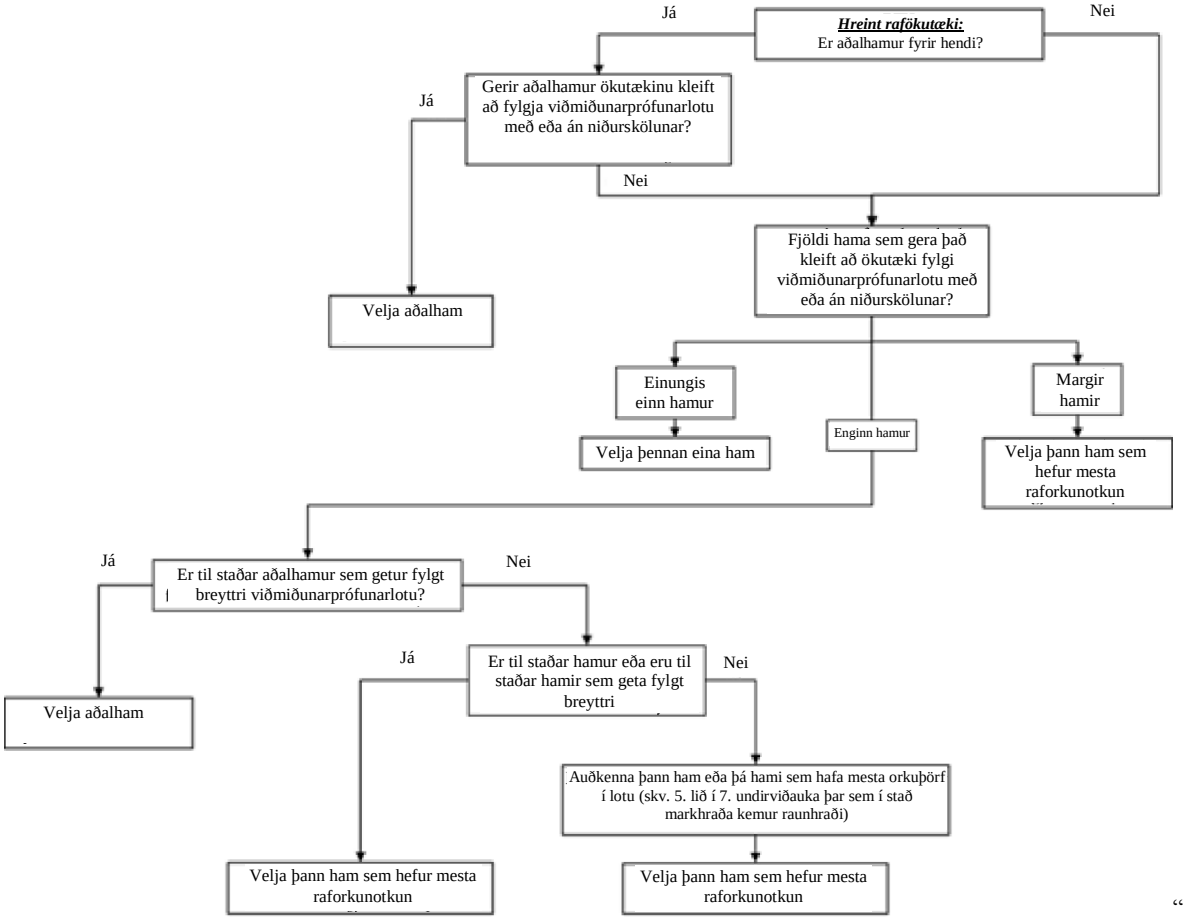
vi. Í stað síðustu málsgreinar í 4. lið kemur eftirfarandi:

„Flæðiritið á mynd A8/viðb.6/3 sýnir valið á ham í samræmi við þennan lið.“

vii. Í stað myndar A8.viðb.6/3 í lið 4.3 kemur eftirfarandi:

„Mynd A8.viðb.6/3

Valkvæður notkunarhamur valinn fyrir hrein rafökutæki



“

bb) Í stað 7. viðbætis kemur eftirfarandi:

„8. undirviðauki – 7. viðbætir

Mæling eldsneytisnotkunar í tvinnökutækjum með efnarafala með þjöppuðu vetni

1. Almennar kröfur

Mæla skal eldsneytisnotkun með þyngdarmælingaraðferð í samræmi við 2. lið þessa viðbætis.

Að beiðni framleiðanda og með samþykki viðurkenningaryfirvalds má mæla eldsneytisnotkun með annaðhvort þrýstingsaðferð eða streymisaðferð. Í því tilviki skal framleiðandi leggja fram tæknigögn sem sýna að samsvarandi niðurstöður fást með aðferðinni. Þrýstings- og streymisaðferðunum er lýst í ISO 23828:2013.

2. Þyngdarmælingaraðferð

Reikna skal út eldsneytisnotkun með því að mæla massa eldsneytisgeymis fyrir og eftir prófun.

2.1. Búnaður og stilling

2.1.1. Dæmi um tækjabúnað er sýnt á mynd A8.viðb.7/1. Nota skal einn eða fleiri geyma utan ökutækis til að mæla eldsneytisnotkun Geymir sem er utan ökutækis skal tengdur við eldsneytisleiðslu ökutækis milli upphaflegs eldsneytisgeymis og efnarafalakerfis.

2.1.2. Fyrir formeðhöndlun má nota upphaflega uppsettan geymi eða ytri vetnisgjafa.

2.1.3. Aðlaga skal þrýsting við eldsneytistöku að tilgreindum gildum framleiðanda.

2.1.4. Lágmarka skal þrýstingsmuninn í leiðslum þegar skipt er um leiðslur.

Ef að búist er við áhrifum af mismunaþrýstingi skulu framleiðandi og viðurkenningaryfirvald koma sér saman um hvort leiðrétting sé nauðsynleg eða ekki.

2.1.5. Vog

2.1.5.1. Vog sem er notuð fyrir mælingu eldsneytisnotkunar skal uppfylla forskriftina í töflu A8.viðb.7/1.

Tafla A8.App7/1

Viðmiðanir fyrir sannprófun fínvogar

Mælikerfi	Upplausn	Nákvæmni
Vog	hámark 0,1 g	hámark ±0,02 ([1])

([1]) Staðalfrávik eldsneytisnotkunar (hleðslujafnvægi endurhlaðanlegs raforkugeymslukerfis = 0) meðan á prófun stendur, gefið upp sem massi.

2.1.5.2. Vog skal kvörðuð samkvæmt forskriftum frá framleiðanda vogarinnar eða a.m.k. eins oft og tilgreint er í töflu A8.viðb.7/2.

Tafla A8.App7/2

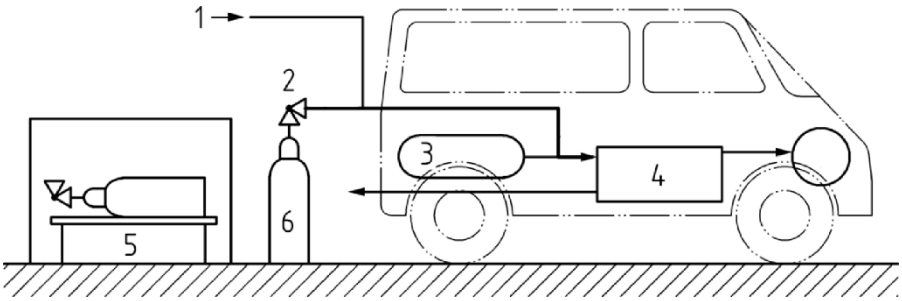
Millibil fyrir kvörðun á mælitækjum

Athuganir mælitækja	Millibil
Nákvæmni	Árlega og við meiri háttar viðhald

2.1.5.3. Viðeigandi leiðir til að draga úr áhrifum titrings og varmastreymis eins og með deyfiborði eða vindtálma skulu vera fyrir hendi.

Mynd A8.viðb.7/1

Dæmi um tækjabúnað



þar sem:

1 er ytri eldsneytisgjafi fyrir formeðhöndlun

2 er þrýstistillir

3 er upphaflegur geymir

4 er efnarafalakerfi

5 er vogin

6 er geymir eða geymar utan ökutækis fyrir mælingu eldsneytisnotkunar

2.2. Prófunarferli

2.2.1. Mæla skal massa geymis utan ökutækis á undan prófun.

2.2.2. Geymir sem er utan ökutækis skal tengdur við eldsneytisleiðslu ökutækis eins og sýnt er á mynd A8.viðb.7/1.

2.2.3. Framkvæma skal prófunina með eldsneytisáfyllingu frá geymi utan ökutækis

2.2.4. Geymir utan ökutækis skal fjarlægður frá leiðslunni.

2.2.5. Mæla skal massa geymis eftir prófun.

2.2.6. Ójöfnuð eldsneytisnotkun í hleðsluham $FC_{CS,nb}$ frá mældum massa fyrir og eftir prófun skal reiknuð út með eftirfarandi jöfnu:

$$FC_{CS,nb} = \frac{g_1 - g_2}{d} \times 100$$

þar sem:

$FC_{CS,nb}$ er ójöfnuð eldsneytisnotkun í hleðsluham meðan á prófun stendur, í kg/100 km,

g_1 er massi geymis við upphaf prófunar, kg,

g_2 er massi geymis við lok prófunar, kg,

d er ekin vegalengd meðan á prófun stendur, í km.“

———

X. VIÐAUKI

„XXII. VIÐAUKI

Innbyggður vöktunarbúnaður fyrir eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun

1. **Inngangur**

Í þessum viðauka eru settar fram skilgreiningar og kröfur sem gilda um innbyggðan vöktunarbúnað fyrir eldsneytisnotkun og/eða raforkunotkun.

2. **Skilgreiningar**

2.1. „*Innbyggður vöktunarbúnaður fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun*“ (OBFCM): allar smíðaeiningar, hvort sem er hugbúnaður og/eða vélbúnaður sem nemur og notar mæliþætti sem varða ökutæki, hreyfil, eldsneyti og/eða raforku sem gerir kleift að ákvarða og gera aðgengileg a.m.k. þau gögn sem mælt er fyrir um í 3. lið og að geyma gildi yfir endingartímann um borð í ökutækinu.

2.2. „*Endingartími*“: gildi af tiltekinni stærð sem er ákvarðað og geymt á tíma *t* skal samsvara gildum þessarar stærðar sem hafa safnast frá því að ökutækið var fullbúið og fram að tímanum *t*.

2.3. „*Eldsneytisstreymi hreyfils*“: magn af innsprautuðu eldsneyti í hreyfilinn á tímaeiningu. Þetta nær ekki til innsprautunar eldsneytis beint í mengunarvarnarbúnaðinn.

2.4. „*Eldsneytisstreymi ökutækis*“: magn af innsprautuðu eldsneyti í hreyfilinn og beint í mengunarvarnarbúnaðinn á tímaeiningu. Þetta nær ekki til eldsneytisins sem er notað í hitara sem gengur fyrir eldsneyti.

2.5. „*Heildarmagn eldsneytisnotkunar (á endingartíma)*“: uppsöfnun á útreiknuðu magni af innsprautuðu eldsneyti í hreyfilinn og útreiknuðu magni af innsprautuðu eldsneyti beint í mengunarvarnarbúnaðinn. Þetta nær ekki til eldsneytisins sem er notað í hitara sem gengur fyrir eldsneyti.

2.6. „*Heildarvegalengd sem farin er (á endingartíma)*“: uppsöfnun á þeirri vegalengd sem farin er með notkun sömu gagnalindar og notuð er fyrir kílómetramæli ökutækis.

2.7. „*Orka úr dreifikerfi*“: fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta raforka sem streymir inn í rafgeyminn þegar ökutækið er tengt við ytri orkugjafa og slökkt er á hreyflinum. Þetta skal ekki ná til rafmagnstaps á milli ytri orkugjafa og rafgeymis.

2.8. „*Rekstur í hleðsluham*“: fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta rekstur ökutækisins þegar hleðsluástand endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins kann að sveiflast en stjórnbúnaði ökutækisins er að meðaltali ætlað að viðhalda yfirstandandi hleðsluástandi.

2.9. „*Rekstur í afhleðsluham*“: fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu er þetta rekstur ökutækisins þegar yfirstandandi hleðsluástand endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins er hærra en markgildið fyrir hleðsluástand í hleðsluham og þó það kunni að sveiflast er stjórnbúnaði ökutækisins ætlað að draga hleðsluástandið af hærra stigi niður í markgildið fyrir hleðsluástand í hleðsluham.

2.10. „*Valkvæð rekstrarskilyrði sem auka hleðslu*“: fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu eru þetta rekstrarskilyrði þar sem ökumaður hefur valið vinnumáta með þeirri ætlun að auka hleðsluástand endurhlaðanlega raforkugeymslukerfisins.

3. **Upplýsingar sem á að ákvarða, geyma og gera aðgengilegar**

Innbyggður vöktunarbúnaður fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun skal gera kleift að ákvarða a.m.k. eftirfarandi mæliþætti og geyma gildi endingartíma um borð í ökutækinu. Mæliþættina skal reikna út og vega samkvæmt þeim stöðlum sem um getur í a-lið liðar 6.5.3.2 í lið 6.5.3 í 1. viðbæti 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 í þeim skilningi sem settur er fram í lið 2.8 í 1. viðbæti við XI. viðauka við þessa reglugerð.

3.1. *Fyrir öll ökutæki sem um getur í 4. gr. a að undanskildum tvinnrafökutækjum ætluðum fyrir ytri hleðslu:*

a) Heildarmagn eldsneytisnotkunar (á endingartíma) (í lítrum),

b) heildarvegalengd sem farin er (á endingartíma) (í kílómetrum),

c) eldsneytisstreymi hreyfils (í g/s),

d) eldsneytisstreymi hreyfils (í l/klst.),

e) eldsneytisstreymi ökutækis (í g/s),

f) hraði ökutækis (í kílómetrum/klukkustund).

3.2. *Fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu:*

a) Heildarmagn eldsneytisnotkunar (á endingartíma) (í lítrum),

b) Heildarmagn eldsneytisnotkunar við rekstur í afhleðsluham (á endingartíma) (í lítrum),

c) heildarmagn eldsneytisnotkunar við valkvæð rekstrarskilyrði sem auka hleðslu (á endingartíma) (í lítrum),

d) heildarvegalengd sem farin er (á endingartíma) (í kílómetrum),

e) heildarvegalengd sem farin er við rekstur í afhleðsluham með hreyfilinn ekki í gangi (á endingartíma) (í kílómetrum),

f) heildarvegalengd sem farin er við rekstur í afhleðsluham með hreyfilinn í gangi (á endingartíma) (í kílómetrum),

g) heildarvegalengd sem farin er við valkvæð rekstrarskilyrði sem auka hleðslu (á endingartíma) (í kílómetrum),

h) eldsneytisstreymi hreyfils (í g/s),

i) eldsneytisstreymi hreyfils (í l/klst.),

j) eldsneytisstreymi ökutækis (í g/s),

k) hraði ökutækis (í kílómetrum/klukkustund),

l) heildarorka úr dreifikerfi í rafgeymi (á endingartíma) (í kWh).

4. **Nákvæmni**

4.1. Að því er varðar upplýsingarnar sem eru tilgreindar í 3. lið skal framleiðandinn tryggja að innbyggði vöktunarbúnaðurinn fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun skili eins nákvæmum gildum og hægt er að fá með mælikerfi og útreikningskerfi stýrieiningar hreyfilsins.

4.2. Þrátt fyrir lið 4.1 skal framleiðandi tryggja að nákvæmnin sé meiri en –0,05 og minni en 0,05 sem er reiknað út með þremur tugastöfum með eftirfarandi formúlu:

$$\text{Nákvæmni} = \frac{\text{Fuel\_Consumed}_{\text{WLTP}} - \text{Fuel\_Consumed}_{\text{OBFCM}}}{\text{Fuel\_Consumed}_{\text{WLTP}}}$$

Þar sem:

$\text{Fuel\_Consumed}_{\text{WLTP}}$ (litres)	er eldsneytisnotkun ákvörðuð við fyrstu prófun sem er framkvæmd í samræmi við lið 1.2 í 6. undirviðauka við XXI. viðauka, reiknuð út í samræmi við 6. lið 7. undirviðauka við þann viðauka með niðurstöðum fyrir losun í heildarlotu áður en leiðréttingar eru gerðar (frálag úr þrepi nr. 2 í töflu A7/1 í 7. undirviðauka), margfaldað með raunverulegu vegalengdinni sem ekin er og deilt með 100.
$\text{Fuel\_Consumed}_{\text{OBFCM}}$ (litres)	er eldsneytisnotkunin sem er ákvörðuð fyrir sömu prófunina með því að nota mismun mæliþáttarins „heildarmagn eldsneytisnotkunar (á endingartíma)“ samkvæmt innbyggðum vöktunarbúnaði fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun.

Nota skal hleðsluprófun 1 fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu.

4.2.1 Ef kröfurnar um nákvæmni sem settar eru fram í lið 4.2 eru ekki uppfylltar skal nákvæmnin endurreiknuð fyrir síðari prófanir 1 sem gerðar eru í samræmi við lið 1.2 í 6. undirviðauka, í samræmi við formúlurnar í lið 4.2 með því eldsneyti sem er notað, ákvarðað og uppsafnað í öllum prófunum sem gerðar eru. Líta skal svo á að þessi krafa um nákvæmni sé uppfyllt þegar nákvæmnin er meiri en –0,05 og minni en 0,05.

4.2.2 Ef kröfurnar um nákvæmni sem settar eru fram í lið 4.2.1 eru ekki uppfylltar eftir síðari prófanir samkvæmt þeim lið er heimilt að gera viðbótarprófanir í þeim tilgangi að ákvarða nákvæmnina, en prófanirnar skulu ekki vera fleiri en þrjár í heild fyrir ökutæki sem er prófað án þess að brúunaraðferðinni sé beitt (ökutæki H) og skulu ekki vera fleiri en sex fyrir ökutæki sem er prófað með beitingu brúunaraðferðarinnar (þrjár prófanir fyrir ökutæki H og þrjár prófanir fyrir ökutæki L). Endurreikna skal nákvæmnina í síðari viðbótarprófunum 1 í samræmi við formúlurnar í lið 4.2 með því eldsneyti sem er notað, ákvarðað og uppsafnað í öllum prófunum sem gerðar eru. Líta skal svo á að þessi krafa sé uppfyllt þegar nákvæmnin er meiri en –0,05 og minni en 0,05. Ekki skal taka tillit til niðurstaðna viðbótarprófananna í neinum öðrum tilgangi ef prófanirnar hafa einungis verið gerðar í þeim tilgangi að ákvarða nákvæmni innbyggðs vöktunarbúnaðar fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun.

5. **Aðgangur að upplýsingunum í innbyggða vöktunarbúnaðinum fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun**

5.1. Innbyggði vöktunarbúnaðurinn fyrir eldsneytis- og/eða orkunotkun skal gera kleift að hafa staðlaðan og óhindraðan aðgang að upplýsingunum sem eru tilgreindar í 3. lið og hann skal vera í samræmi við staðlana sem um getur í a-lið liðar 6.5.3.1 og a-lið liðar 6.5.3.2 í lið 6.5.3 í 1. viðbæti við 11. viðauka við reglugerð efnahagsnefndar Sameinuðu þjóðanna fyrir Evrópu nr. 83 í þeim skilningi sem settur er fram í lið 2.8 í 1. viðbæti XI. viðauka við þessa reglugerð.

5.2. Þrátt fyrir skilyrðin um endurstillingu sem tilgreind eru í stöðlunum sem um getur í lið 5.1 og þrátt fyrir liði 5.3 og 5.4 skal geyma gildi endingartímateljaranna þegar ökutækið hefur verið tekið í notkun.

5.3. Einungis má endurstilla gildi endingartímateljaranna fyrir þau ökutæki sem hafa stýrieiningu hreyfils með gerð minnis sem getur ekki geymt gögn án þess að hafa raforku. Fyrir þau ökutæki má einungis endurstilla gildin samtímis ef rafgeymirinn er aftengdur úr ökutækinu. Skuldbindingin um að geyma gildi endingartímateljaranna skal í þessu tilviki gilda um nýjar gerðarviðurkenningar eigi síðar en frá 1. janúar 2022 og frá 1. janúar 2023 fyrir ný ökutæki.

5.4. Ef bilun hefur áhrif á gildi endingartímateljaranna eða ef skipt er um stýrieiningu hreyfils er heimilt að endurstilla mælana samtímis til að tryggja að gildin haldist að fullu samstillt.“

———

XI. VIÐAUKI

Ákvæðum I., III., VIII. og IX. viðauka við tilskipun 2007/46/EB er breytt sem hér segir:

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

a) Eftirfarandi liðir 0.2.2.1 til 0.2.3.9 bætast við:

„0.2.2.1. Leyfð gildi mæliþátta fyrir fjölþrepa gerðarviðurkenningu til að nota losunargildi grunnökutækis (tilgreina skal svið ef við á) (y):

Massi fullbúins ökutækis sem er tilbúið til aksturs (í kg): …

Framhlið fullbúins ökutækis (í cm^2): …

Snúningsmótstaða (í kg/t): …

Þversniðsflatarmál loftinnstreymisops á vatnskassarist (í cm^2): …

0.2.3. Auðkenni (y):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps:

0.2.3.4.1. Ökumótstöðuhópur hálosandi ökutækis: …

0.2.3.4.2. Ökumótstöðuhópur láglosandi ökutækis: …

0.2.3.4.3. Ökumótstöðuhópar sem eiga við eru í brúunarhópi: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps: …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …

0.2.3.8. Auðkenni hóps með innbyggt greiningarkerfi: …

0.2.3.9. Auðkenni annars hóps: …“.

b) Eftirfarandi liður 2.6.3 bætist við:

„2.6.3. Snúningsmassi (y): 3% af summu massa ökutækis sem er tilbúið til aksturs og 25 kg eða gildi á hverjum ás (kg): …“.

c) Í stað liðar 3.2.2.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.2.1. Dísilolía/bensín/fljótandi jarðolíugas/jarðgas eða lífmetan/etanól(E85)/lífdísilolía/vetni (1) (6)“.

d) Eftirfarandi liður 3.2.12.0 bætist við:

„3.2.12.0. Eiginleiki losunar fyrir gerðarviðurkenningu (y)“.

e) Í stað liðar 3.2.12.2.5.5 kemur eftirfarandi:

„3.2.12.2.5.5. Teikning af eldsneytisgeyminum (eingöngu fyrir bensín- og etanólhreyfla): …“.

f) Eftirfarandi liðir bætast við á eftir lið 3.2.12.2.5.5:

„3.2.12.2.5.5.1. Rúmtak, smíðaefni og smíði eldsneytisgeymiskerfis: …

3.2.12.2.5.5.2. Lýsing á efnivið gufuslöngu, efnivið eldsneytisleiðslu og aðferð við tengingu eldsneytiskerfis: …

3.2.12.2.5.5.3. Þéttlokað eldsneytisgeymslukerfi: já/nei

3.2.12.2.5.5.4. Lýsing á stillingu öryggisloka eldsneytisgeymis (inntaka og losun lofts): …

3.2.12.2.5.5.5. Lýsing á hreinsibúnaðarkerfi: …“.

g) Eftirfarandi liður 3.2.12.2.5.7 bætist við:

„3.2.12.2.5.7. Gegndræpistuðull: …“.

h) Eftirfarandi liður 3.2.12.2.5.12 bætist við:

„3.2.12.2.12. Vatnsinnsprautun: já/nei (1)“.

i) Liður 3.2.19.4.1 fellur brott.

j) Í stað liðar 3.2.20 kemur eftirfarandi:

„3.2.20. Upplýsingar um varmageymslu (y)“.

k) Í stað liðar 3.2.20.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.20.1. Virkur varmageymslubúnaður: já/nei (1)“.

l) Í stað liðar 3.2.20.2 kemur eftirfarandi:

„3.2.20.2. Einangrunarefni: já/nei (1)“.

m) Eftirfarandi liðir 3.2.20.2.5 til 3.2.20.2.6 bætast við:

„3.2.20.2.5. Kæling ökutækis við verstu hugsanlegu aðstæður: já/nei (1)

3.2.20.2.5.1. (ekki verstu hugsanlegu aðstæður) lágmarkstími til að koma á varmajafnvægi, t_{soak_ATCT} (í klukkustundum): …

3.2.20.2.5.2. (ekki verstu hugsanlegu aðstæður) staðsetning á hitamælingu hreyfils: …

3.2.20.2.6. Nálgun með einum brúunarhóp í ATCT-hópi: já/nei (1)“.

n) Í stað liða 3.5.7.1 og 3.5.7.1.1 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.1. Mæliþættir fyrir prófunarökutækið (y)

Ökutæki	Láglosandi ökutæki (VL) ef fyrirliggjandi	Hálosandi ökutæki (VH)	VM ef fyrirliggjandi	Dæmigert gildi V (eingöngu fyrir ökumótstöðu-fylkjahóp) (*)	Sjálfgildi
Gerð yfirbyggingar ökutækis (afbrigði/útfærsla)			—		
Aðferð sem notuð er til að mæla ökumótstöðu (mæling eða útreikningur miðað við ökumótstöðuhóp)			—	—	
Upplýsingar um ökumótstöðu:					
Tegund og gerð hjólbarða, ef mæling er gerð			—		
Hjólbarðastærð (framan/aftan), ef mæling er gerð			—		
Snúningsmótstaða hjólbarða (framan/aftan) (í kg/t)					
Þrýstingur í hjólbörðum (framan/aftan) (í kPa), ef mæling er gerð					
Delta $C_D \times A$ fyrir ökutæki L í samanburði við ökutæki H (IP_H að frádregnu IP_L)	—		—	—	
Delta $C_D \times A$ í samanburði við ökutæki L í ökumótstöðuhópi (IP_H/L að frádregnu RL_L) ef útreikningur fer eftir ökumótstöðuhópi			—	—	
Prófunarmassi ökutækis (kg)					

Ökutæki	Láglosandi ökutæki (VL) ef fyrirliggjandi	Hálosandi ökutæki (VH)	VM ef fyrirliggjandi	Dæmigert gildi V (eingöngu fyrir ökumótstöðu-fylkjahóp) (*)	Sjálfgildi
Ökumótstöðustuðlar					
f_0 (N)					
f_1 (N/(km/klst.))					
f_2 (N/(km/klst.)^2)					
Framhlið m^2 (0,000 m^2)	—	—	—		
Orkuþörf í lotu (J)					

(*) Dæmigert ökutæki er prófað fyrir ökumótstöðufylkjahópinn.

3.5.7.1.1. Eldsneyti sem er notað í prófun 1 og er valið fyrir mælinguna á nettóafli í samræmi við XX. viðauka við þessa reglugerð (einungis fyrir ökutæki sem ganga fyrir fljótandi jarðolíugasi eða jarðgasi) .....“.

o) Liðir 3.5.7.1.1.1 til 3.5.7.1.3.2.3 falla brott.

p) Í stað liða 3.5.7.2.1 til 3.5.7.2.1.2.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.1. Massalosun koltvísýrings fyrir hrein brunahreyfilsökutæki og tvinnrafökutæki, sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.1.0. Lágmarksgildi og hámarksgildi koltvísýrings í brúunarhópi

3.5.7.2.1.1. Hálosandi ökutæki: ..... g/km

3.5.7.2.1.1.0. Hálosandi ökutæki (NEDC): ..... g/km

3.5.7.2.1.2. Láglosandi ökutæki (ef við á): ..... g/km

3.5.7.2.1.2.0. Láglosandi ökutæki (ef við á) (NEDC): ..... g/km

3.5.7.2.1.3. Miðlosandi ökutæki (ef við á): ..... g/km

3.5.7.2.1.3.0. Miðlosandi ökutæki (ef við á) (NEDC): ..... g/km“.

r) Í stað liða 3.5.7.2.2 til 3.5.7.2.2.3.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.2. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.2.1. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham fyrir hálosandi ökutæki: í g/km

3.5.7.2.2.1.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings fyrir hálosandi ökutæki (NEDC-skilyrði B): í g/km

3.5.7.2.2.2. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham fyrir láglosandi ökutæki (ef við á): í g/km

3.5.7.2.2.2.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings fyrir láglosandi ökutæki (ef við á) (NEDC-skilyrði B): í g/km

3.5.7.2.2.3. Massalosun koltvísýrings í hleðsluham fyrir ökutæki M (ef við á): í g/km

3.5.7.2.2.3.0. Samanlögð massalosun koltvísýrings fyrir ökutæki M (ef við á) (NEDC-skilyrði B): í g/km“.

s) Í stað liða 3.5.7.2.3 til 3.5.7.2.3.3.0 kemur eftirfarandi:

„3.5.7.2.3. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham og vegin massalosun koltvísýrings fyrir tvinnrafökutæki ætluð fyrir ytri hleðslu

3.5.7.2.3.1. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir hálosandi ökutæki: … g/km

3.5.7.2.3.1.0. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir hálosandi ökutæki (NEDC-skilyrði A): … g/km

3.5.7.2.3.2. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir láglosandi ökutæki (ef við á): … g/km

3.5.7.2.3.2.0. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir láglosandi ökutæki (ef við á) (NEDC-skilyrði A): … g/km

3.5.7.2.3.3. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir ökutæki M (ef við á): … g/km

3.5.7.2.3.3.0. Massalosun koltvísýrings í afhleðsluham fyrir ökutæki M (ef við á) (NEDC-skilyrði A): ... g/km“.

s) Eftirfarandi liður 3.5.7.2.3.4 bætist við:

„3.5.7.2.3.4. Vegin lágmarksgildi og hámarksgildi koltvísýrings í brúunarhópi fyrir ökutæki sem eru ætluð fyrir ytri hleðslu“.

t) Liður 3.5.7.4.3 fellur brott.

u) Í stað liðar 3.5.8.3 og töflunnar í þeim lið kemur eftirfarandi:

„3.5.8.3. Losungargögn í tengslum við notkun vistvænnar nýsköpunar (gera skal sams konar töflu fyrir hvert viðmiðunareldsneyti sem er prófað) (w^1)

Ákvörðun um viðurkenningu á vistvænni nýsköpun (w^2)	Kóði fyrir vistvæna nýsköpun (w^3)	1. Losun koltvísýrings frá grunnviðmiðunarökutækinu (g/km)	2. Losun koltvísýrings frá ökutæki sem búið er vistvænni nýsköpun (g/km)	3. Losun koltvísýrings frá grunnviðmiðunarökutækinu í prófunarlotu prófunar 1 (w^4)	4. Losun koltvísýrings frá ökutæki sem búið er vistvænni nýsköpun í prófunarlotu 1	5. Notkunarstuðull (UF), þ.e. skipting í tímabil, sem tæknin er notuð við venjulegar notkunaraðstæður	Sparnaður í losun koltvísýrings ((1– 2) – (3 – 4))*5
xxxx/201x							

NEDC-heildarsparnaður í losun koltvísýrings (g/km) (w^5)
WLTP-heildarsparnaður í losun koltvísýrings (g/km) (w^5)“.

v) Eftirfarandi liður 3.8.5 bætist við:

„3.8.5. Forskrift smurefnis: … W …“.

w) Liðir 4.5.1.1 til 4.5.1.3 falla brott.

x) Neðst í fyrsta dálki töflunnar í lið 4.6 fellur brott orðið „Bakkgír“.

y) Eftirfarandi liðir 4.6.1 til 4.6.1.7.1 bætast við:

„4.6.1. Gírskipting (y)

4.6.1.1. Gír 1 útilokaður: já/nei (^{1})

4.6.1.2. n_{95_high} fyrir hvern gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3. n_{min_drive}

4.6.1.3.1. 1. gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.2. 1. gír í 2. gír:... $mín^{-1}$

4.6.1.3.3. 2. gír í kyrrstöðu: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.4. 2. gír: … $mín^{-1}$

4.6.1.3.5. 3. gír og ofar: … $mín^{-1}$

4.6.1.4. $n_{min\_drive\_set}$ fyrir hröðunarfasa/fasa með stöðugum hraða ($n_{min\_drive\_up}$): … $mín^{-1}$

4.6.1.5. $n_{min\_drive\_set}$ fyrir hraðaminnkunarfasa ($n_{min\_drive\_down}$):

4.6.1.6. fyrsta tímabil

4.6.1.6.1. t_{start_phase}: … s

4.6.1.6.2. $n_{min\_drive\_start}$: … $mín^{-1}$

4.6.1.6.3. $n_{min\_drive\_up\_start}$: … $mín^{-1}$

4.6.1.7. beiting ASM: já/nei (1)

4.6.1.7.1. ASM-gildi: …“.

z) Eftirfarandi liður 4.12 bætist við:

„4.12. Smurolía fyrir gírkassa: … W …“.

aa) Eftirfarandi liðir 12.8 til 12.8.3.2 bætast við:

„12.8. Búnaður eða kerfi með valkvæðum notkunarhömum sem hafa áhrif á koltvísýringslosun og/eða markgildalosun og hafa engan aðalham: já/nei (1)

12.8.1. Hleðsluprófun (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.1.1. Besti hamur: …

12.8.1.2. Versti hamur: …

12.8.2. Afhleðsluprófun (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.2.1. Besti hamur: …

12.8.2.2. Versti hamur: …

12.8.3. Prófun 1 (ef við á) (tilgreina fyrir hvern búnað eða kerfi)

12.8.3.1. Besti hamur: …

12.8.3.2. Versti hamur: …“.

ab) Í skýringunum bætist við eftirfarandi neðanmálsgrein (y):

„(y) Einungis vegna viðurkenningar samkvæmt reglugerð (EB) nr. 715/2007 og breytingum á henni.“

2) Ákvæðum III. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Eftirfarandi liður 0.2.2.1 bætist við:

„0.2.2.1. Leyfð gildi mæliþátta fyrir fjölþrepa gerðarviðurkenningu til að nota losunargildi grunnökutækis (tilgreina skal svið ef við á) (y):

Massi fullbúins ökutækis (í kg): …

Framhlið fullbúins ökutækis (í cm^2): …

Snúningsmótstaða (í kg/t): …

Þversniðsflatarmál loftinnstreymisops á vatnskassarist (í cm^2): …“.

b) Í stað liðar 3.2.2.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.2.1. Dísilolía/bensín/fljótandi jarðolíugas/jarðgas eða lífmetan/etanól(E85)/lífdísilolía/vetni (1) (6)“.

c) Eftirfarandi liður 3.2.12.2.8.2.2 bætist við:

„3.2.12.2.8.2.2. Virkjun skriðhams „gerður óvirkur eftir endurræsingu“/„gerður óvirkur eftir eldsneytisáfyllingu“/„gerður óvirkur eftir að ökutæki er lagt“ (7)“.

d) Í stað liðar 3.2.12.8.8.1 kemur eftirfarandi:

„3.2.12.2.8.8.1. Skrá yfir íhluti kerfa í ökutæki sem tryggja rétta virkni NO_x-varnarráðstafana“.

3) Ákvæðum VIII. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað línunnar í lið 2.1.1:

„Fjöldi agna (PN) (#/km) (1)“

kemur eftirfarandi:

„Fjöldi agna (PN) (#/km) (ef við á)“.

b) Í stað línunnar í lið 2.1.5:

„Fjöldi agna (PN) (1)“

kemur eftirfarandi:

„Fjöldi agna (PN) (ef við á)“.

c) Í stað síðustu sjö línanna í töflu 3 í lið 3.1 kemur eftirfarandi:

„f_0 (N)	…	…	…	
f_1 (N/(km/klst.))	…	…	…	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	…	…	…	
RR (kg/t)	…	…	…	
Delta Cd * A (fyrir láglosandi ökutæki, ef við á samanborið við hálosandi ökutæki) (m^2)	…	…	…	
Prófunarmassi (kg)	…	…	…	
Framhlið (m^2) (eingöngu fyrir ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi)“.				

d) Í stað síðustu sjö línanna í töflu 3 í lið 3.2 kemur eftirfarandi:

„f_0 (N)	…		…	
f_1 (N/(km/klst.))	…		…	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	…		…	
RR (kg/t)	…		…	
Delta C_D × A (fyrir láglosandi eða miðlungslosandi ökutæki ef við á samanborið við hálosandi ökutæki) (m^2)	…		…	
Prófunarmassi (kg)	…		…	
Framhlið (m^2) (eingöngu fyrir ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi)“.				

e) Í stað síðustu sjö línanna í töflu 3 í lið 3.3 kemur eftirfarandi:

„f_0 (N)	…	…	
f_1 (N/(km/klst.))	…	…	
f_2 (N/(km/klst.)^2)	…	…	
RR (kg/t)	…	…	
Delta C_D × A (fyrir láglosandi ökutæki samanborið við hálosandi ökutæki) (m^2)	…	…	
Prófunarmassi (kg)	…	…	
Framhlið (m^2) (eingöngu fyrir ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi)“.			

f) Í stað annarrar töflu í lið 3.4 kemur eftirfarandi:

	„Afbrigði/útfærsla:	Afbrigði/útfærsla
Eldsneytisnotkun (blandaður akstur) (í kg/100 km)	…	…
„f_0 (N)	…	…
f_1 (N/(km/klst.))	…	…

	„Afbrigði/útfærsla:	Afbrigði/útfærsla
f_2 (N/(km/klst.)^2)	…	…
RR (kg/t)	…	…
Prófunarmassi (kg)	…“	

g) Í stað fyrirsagnar liðar 3.5 kemur eftirfarandi:

„Frálagsskýrsla eða frálagsskýrslur fylgnitóls í samræmi við reglugerð (ESB) 2017/1152 og/eða 2017/1153 og endanleg NEDC-gildi“.

h) Eftirfarandi liðir 3.5.3 og 3.5.4 bætast við:

„3.5.3. Ökutæki með brunahreyfli, þ.m.t. tvinnrafökutæki sem ekki eru ætluð fyrir ytri hleðslu (NOVC) (1) (2)

Endanleg fylgnigildi NEDC-koltvísýringslosunar	Auðkenni brúunarhóps	
	Hálosandi ökutæki	Láglosandi ökutæki (ef við á)
Massalosun koltvísýrings (akstur í þéttbýli) (g/km)		
Massalosun koltvísýrings (akstur í dreifbýli) (g/km)		
Massalosun koltvísýrings (blandaður akstur) (g/km)		
Eldsneytisnotkun (akstur í þéttbýli): l/100 km (1)		
Eldsneytisnotkun (akstur utan þéttbýlis): l/100 km (1)		
Eldsneytisnotkun (blandaður akstur) (í l/100 km) (1)		

3.5.4. *Fjölknúið rafökutæki sem hægt er að hlaða utan ökutækisins (OVC)* (1)

Endanleg fylgnigildi NEDC-koltvísýringslosunar	Auðkenni brúunarhóps	
	Hálosandi ökutæki	Láglosandi ökutæki (ef við á)
Massalosun koltvísýrings (veginn, blandaður akstur) (g/km)	…	…
Eldsneytisnotkun (veginn, blandaður akstur) (í l/100 km) (g)	…	…“

4) Ákvæðum IX. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Ákvæðum I. hluta er breytt sem hér segir:

i. Eftirfarandi liðir bætast við í fyrirmynd A1 — síðu 1 í samræmisvottorðinu fyrir fullbúin ökutæki:

„0.2.3. Auðkenni (ef við á) (r):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps (ef við á): …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …“.

ii. Eftirfarandi liðir bætast við í fyrirmynd A2 — síðu 1 í samræmisvottorðinu fyrir fullbúin ökutæki sem eru gerðarviðurkennd í litlum framleiðsluröðum:

„0.2.3. Auðkenni (ef við á) ([r]):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps (ef við á): …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …“.

iii. Eftirfarandi nýir liðir bætast við í fyrirmynd B — síðu 1 í samræmisvottorðinu fyrir fullbúin ökutæki í áföngum:

„0.2.3. Auðkenni (ef við á) ([r]):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps (ef við á): …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …“.

iv. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk M1 (fullbúin ökutæki og fullbúin ökutæki í áföngum) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28. til 28.1.2 bætast við:

„28. Gírkassi (gerð): …

28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Aksturslota ([r])

47.2.1. Aksturslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

— Í stað skýringartexta töflunnar í 1. undirlið 49. liðar kemur eftirfarandi:

„NEDC-gildi	Losun CO^2	Eldsneytisnotkun“.

v. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk M2 (fullbúin ökutæki og fullbúin ökutæki í áföngum) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28.1, 28.1.1 og 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— vi. Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Aksturslota ([r])

47.2.1. Aksturslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

— Í stað skýringartexta töflunnar í 1. undirlið 49. liðar kemur eftirfarandi:

„NEDC-gildi	Losun CO^2	Eldsneytisnotkun“.

vi. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk N1 (fullbúin ökutæki og fullbúin ökutæki í áföngum) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28.1, 28.1.1 og 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akturslota ([r])

47.2.1. Akturslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

— Í stað skýringartexta töflunnar í 1. undirlið 49. liðar kemur eftirfarandi:

„NEDC-gildi	Losun CO^2	Eldsneytisnotkun“.

— Eftirfarandi lína bætist við í töflunni í 1. undirlið 49. liðar:

„Sannprófunarstuðull (ef við á)	1 eða 0“.

vii. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk N2 (fullbúin ökutæki og fullbúin ökutæki í áföngum) er breytt sem hér segir:

— Í stað 7. liðar kemur eftirfarandi:

„7. Hæð ([r]): … mm“.

— Eftirfarandi liðir 28.1, 28.1.1 og 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akursturslota ([r])

47.2.1. Akursturslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

— Í stað skýringartexta töflunnar í 1. undirlið 49. liðar kemur eftirfarandi:

„NEDC-gildi	Losun CO^2	Eldsneytisnotkun“.

— Eftirfarandi lína bætist við í töflunni í 1. undirlið 49. liðar:

„Sannprófunarstuðull (ef við á)	1 eða 0“.

viii. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk N3 (fullbúin ökutæki og fullbúin ökutæki í áföngum) er breytt sem hér segir:

— Liður 7. fellur brott.

b) Ákvæðum II. hluta er breytt sem hér segir:

i. Eftirfarandi liðir 0.2.3 til 0.2.3.7 bætast við í fyrirmynd C1 — síðu 1 í samræmisvottorðinu fyrir ófullbúin ökutæki:

„0.2.3. Auðkenni (ef við á) ([r]):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps: …

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps (ef við á): …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …“.

ii. Eftirfarandi liðir 0.2.3 til 0.2.3.7 bætast við í fyrirmynd C2 — síðu 1 í samræmisvottorðinu fyrir ófullbúin ökutæki sem eru gerðarviðurkennd í litlum framleiðsluröðum:

„0.2.3. Auðkenni (ef við á) ([r]):

0.2.3.1. Auðkenni brúunarhóps: …

0.2.3.2. Auðkenni ATCT-hóps: …

0.2.3.3. Auðkenni PEMS-prófunarhóps: …

0.2.3.4. Auðkenni ökumótstöðuhóps:...

0.2.3.5. Auðkenni ökumótstöðufylkjahóps (ef við á): …

0.2.3.6. Auðkenni hóps með reglubundna endurnýjun: …

0.2.3.7. Auðkenni hóps fyrir prófun á losun við uppgufun: …“.

iii. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk M1 (ófullbúin ökutæki) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28. til 28.1.2 bætast við:

„28. Gírkassi (gerð): …

28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— vi. Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akturslota ([r])

47.2.1. Akturslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

iv. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk M2 (ófullbúin ökutæki) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28.1 til 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akstursslota ([r])

47.2.1. Akstursslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

v. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk N1 (ófullbúin ökutæki) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28.1, 28.1.1 og 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akstursslota ([r])

47.2.1. Akstursslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

vi. Síðu 2 í samræmisvottorðinu fyrir ökutækjaflokk N2 (ófullbúin ökutæki) er breytt sem hér segir:

— Eftirfarandi liðir 28.1, 28.1.1 og 28.1.2 bætast við:

„28.1. Gírhlutföll (fylla skal út fyrir ökutæki með beinskiptingu) ([r])

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…

28.1.1. Endanlegt drifhlutfall (ef við á): …

28.1.2. Endanleg drifhlutföll (fylla skal út eftir atvikum)

1. gír	2. gír	3. gír	4. gír	5. gír	6. gír	7. gír	8. gír	…“

— Í stað 35. liðar kemur eftirfarandi:

„35. Hjólbarðar sem eru settir á ökutæki/hjólasamsetning/orkunýtniflokkur veltiviðnámsstuðla (RRC) og flokkur hjólbarða notuð við ákvörðun koltvísýrings (ef við á) ([h]) ([r]): …“.

— Í stað liðar 47.1 kemur eftirfarandi:

„47.1. Mæliþættir fyrir losunarprófun á V_{ind} ([r])“.

— Í stað liðar 47.1.2 kemur eftirfarandi:

„47.1.2. Framhlið m^2 ([t]): …“.

— Eftirfarandi liður 47.1.2.1 bætist við:

„47.1.2.1. Áætluð framhlið loftinnstreymisops á vatnskassarist (ef við á), í cm^2: …“.

— Eftirfarandi liðir 47.2 til 47.2.3 bætast við:

„47.2. Akstursslota ([r])

47.2.1. Akstursslota í flokki: 1/2/3a/3b

47.2.2. Niðurskölunarstuðull (f_{dsc}): …

47.2.3. Takmörkun á hraða: já/nei“.

c) Skýringunum sem varða IX. viðauka er breytt sem hér segir:

i. Eftirfarandi kemur í stað skýringar (h):

„h) Færa má valfrjálsan búnað og viðbótar hjólbarða-/hjólasamsetningar undir þessum bókstaf undir færsluna „Athugasemdir“. Ef ökutæki er afhent með heilu setti af venjulegum hjólum og hjólbörðum ásamt heilu setti af snjóhjólbörðum (með 3PMS-merkingu – fjall með þremur toppum og snjókorni (e. *3 Peaked Mountain and Snowflake*) með eða án hjóla skulu snjóhjólbarðarnir og hjól þeirra eftir atvikum teljast sem viðbótar hjólbarða-/hjólasamsetningar án tillits til þeirra hjóla/hjólbarða sem í rauninni eru sett undir ökutækið.“

ii. Eftirfarandi skýringar bætist við:

„(t) á einungis við um einstök ökutæki í ökumótstöðufylkjahópi (RMLF).“

5) Eftirfarandi breytingar eru gerðar á XI. viðauka:

Í stað skýringar ([1]) í skýringunum kemur eftirfarandi:

„1. Fyrir ökutæki með viðmiðunarmassa ekki meiri en 2610 kg. Getur, að ósk framleiðanda, átt við ökutæki með viðmiðunarmassa ekki meiri en 2840 kg eða ef ökutækið er til sérstakra nota með kóðanum SB sem varðar brynvarin ökutæki sem einnig hafa viðmiðunarmassa meiri en 2840 kg. Að því er varðar aðgang að upplýsingum um aðra hluta en sjálft grunnökutækið (t.d. vistarverur) nægir að framleiðandinn veiti greiðan og skjótan aðgang að upplýsingum um viðgerðir og viðhald.“

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2019/1390 2020/EES/73/11

frá 31. júlí 2019

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) Efnahags- og framfarastofnunin þróar samræmdar og alþjóðlega samþykktar viðmiðunarreglur um prófanir að því er varðar prófanir á íðefnum í eftirlitsskyni. Efnahags- og framfarastofnunin birtir reglulega nýjar og endurskoðaðar viðmiðunarreglur um prófanir að teknu tilliti til framfara í vísindum á því sviði.

3) Til að taka tillit til tækniframfara og, þegar unnt er, til að fækka dýrum sem eru notuð í tilraunaskyni í samræmi við 2. mgr. 13. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006 ætti, í kjölfar samþykktar á viðeigandi OECD-viðmiðunarreglum um prófanir, að mæla fyrir um tvær nýjar prófunaraðferðir til að meta visteiturhrif og níu nýjar prófunaraðferðir til að ákvarða eiturhrif á heilbrigði manna og uppfæra ætti sjö prófunaraðferðir. Ellefu þessara prófunaraðferða tengjast prófunum í glasi á húðætingu/-ertingu og augnætingu/-ertingu, húðnæmingu, erfðaeiturhrifum og áhrifum á innkirtla. Haft var samráð við hagsmunaaðila um breytingartillöguna.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 247, 26.9.2019, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 10/2020 frá 7. febrúar 2020 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn (bíður 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).

4) Því ætti að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.

5) 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 31. júlí 2019.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

VIÐAUKI

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt sem hér segir:

1) Í stað kafla B.4 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.4 **BRÁÐ HÚÐERTING/ÆTING**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (2015). OECD-viðmiðunarreglur um prófanir á íðefnum eru endurskoðaðar reglulega til að tryggja að þær endurspegli bestu fyrirliggjandi vísindi. Við endurskoðun á OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir var sérstaklega hugað að hugsanlegum endurbótum með tilliti til velferðar dýra og að mati á öllum fyrirliggjandi upplýsingum um prófunaríðefnið til að komast hjá ónauðsynlegum prófunum á tilraunadýrum. Í uppfærðri útgáfu af OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (upphaflega samþykkt árið 1981, endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) er tilvísun í leiðbeiningarskjalið um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) á húðertingu/ætingu (1. heimild) þar sem lögð er til nálgun í einingum fyrir prófanir á húðertingu og húðætingu. Í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (1. heimild). Að auki er í þeim leiðbeiningum mælt með því, ef þörf er á, að prófunarplástrarnir þrír í fyrstu prófuninni *í lífi* séu ekki settir samtímis á dýrið heldur hver á eftir öðrum.

2. Skilgreiningar á húðertingu og -ætingu eru settar fram í viðbætinum við þessa prófunaraðferð.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

3. Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki gera prófun *í lífi* fyrr en búið er að meta öll fyrirliggjandi gögn sem varða hugsanleg ætandi eða ertandi áhrif prófunaríðefnisins á húð og er það gert með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga, eins og sett er fram í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat á húðætingu og -ertingu, þ.e. í þremur hlutum leiðbeiningaskjalsins og samsvarandi einingum þeirra (1. heimild). Í 1. hluta er í sjö einingum fjallað um fyrirliggjandi gögn sem ná yfir gögn um menn, gögn um rannsóknir *í lífi*, gögn um rannsóknir *í glasi*, gögn um eðlisefnafræðilega eiginleika (t.d. sýrustig, einkum hátt sýruinnihald eða mikil basavirkni) og aðferðir án prófana. Í 2. hluta er gerð greining á vægi rökstuddra vísbendinga. Ef þessi greining á vægi rökstuddra vísbendinga er enn ófullnægjandi ætti að framkvæma 3. hluta með viðbótarprófunum, þar sem byrjað er á prófunum *í glasi* og prófanir *í lífi* eru aðeins notaðar sem síðasta úrræði. Þessi greining ætti því að draga úr þörfinni fyrir prófanir *í lífi* á ætandi eða ertandi áhrifum prófunaríðefna ef þegar liggja fyrir fullnægjandi vísbendingar úr öðrum rannsóknum viðvíkjandi þessum tveimur endapunktum.

MEGINREGLA PRÓFUNAR Í LÍFI

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

5. Dýr, sem sýna viðvarandi merki um mikla þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og prófunaríðefnið metið í samræmi við þetta. Viðmiðanir fyrir ákvörðun um mannúðlega aflífun dauðvona og sárþjáðra dýra eru viðfangsefni sérstaks leiðbeiningarskjals (2. heimild).

UNDIRBÚNINGUR FYRIR PRÓFUN Í LÍFI

Val á dýrategund

6. Kanínuhvítingjar eru ákjósanlegustu tilraunadýrin og skal nota heilbrigðar, ungar, fullvaxnar kanínur. Ef notuð er önnur dýrategund skal það rökstutt.

Undirbúningur dýranna

7. Um það bil 24 klukkustundum fyrir prófun skal feldurinn á hrygg dýranna snöggklipptur. Gæta skal þess að skaða ekki húðina og skal einungis nota dýr með heilbrigða og óskaddaða húð.

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

Aðbúnaður og fóðrun

9. Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 °C (± 3 ºC) fyrir kanínur. 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. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Prófunaríðefnið borið á

10. Prófunaríðefnið skal borið á lítið húðsvæði (um það bil 6 cm^2) og hulið með grisju sem haldið er fastri með plástri sem veldur engri ertingu. Ef ekki er unnt að bera efnið beint á (t.d. ef prófunaríðefnið er fljótandi eða maukkennt) skal setja prófunaríðefnið á grisjuna og leggja hana síðan á húðina. Grisjunni skal haldið í lauslegri snertingu við húðina með hentugum, hálfloftþéttum umbúðum allan váhrifatímann. Ef prófunaríðefnið er sett á grisjuna skal festa hana við húðina þannig að prófunaríðefnið sé í náinni snertingu við húðina og dreifist jafnt á hana. Koma skal í veg fyrir að dýrið nái til grisjunnar og innbyrði prófunaríðefnið eða andi því að sér.

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

12. Í lok váhrifatímabilsins, sem er venjulega fjórar klukkustundir, skal fjarlægja leifar af prófunaríðefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hentugu leysiefni og varast að breyta framkallaðri svörun eða skaða húðþekjuna.

Skammtastærð

13. Borinn er skammtur, sem nemur 0,5 ml af vökva eða 0,5 g af föstu eða maukkenndu efni, á prófunarstaðinn.

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

14. Hafi prófunaríðefni verið dæmt ætandi, ertandi eða óflokkað á grundvelli greiningar á vægi rökstuddra vísbendinga eða fyrri prófunar *í glasi* er yfirleitt ekki þörf á frekari prófun *í lífi*. Í þeim tilvikum þar sem talin er þörf á frekari gögnum vegna ófullnægjandi niðurstaðna er þó gerð prófun *í lífi* fyrst með einu dýri með eftirfarandi aðferð. Allt að þrjár prófunargrisjur eru settar, hver á eftir annarri, á dýrið. Fyrsta grisjan er fjarlægð eftir þrjár mínútur. Verði ekki vart ákafrar svörunar í húðinni er önnur grisja sett á annað svæði og fjarlægð að klukkustund liðinni. Ef athuganir á þessu stigi benda til þess að mannúðarsjónarmið leyfi að váhrifatíminn sé allt að fjórar klukkustundir skal þriðja grisjan sett á og fjarlægð að fjórum klukkustundum liðnum og svörunin flokkuð.

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

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

Staðfestingarprófun (húðertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)

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

Athugunartímabil

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

Klínískar athuganir og flokkun húðviðbragða

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

20. Flokkun húðsvörunar er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á flokkun húðsvörunar, og til að aðstoða prófunarstofur 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 (sjá töfluna hér á eftir). Myndskreyttur leiðarvísir um flokkun húðertingar og annarra vefjaskemmda gæti komið að góðum notum (3. heimild).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

21. Rannsóknarniðurstöðurnar skulu teknar saman í töflu í lokaskýrslu prófunar og skal þar getið allra atriða sem talin eru upp í lið 24.

Mat á niðurstöðum

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

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

Prófunarskýrsla

24. 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 viðmiðunarefnum,

— greiningin á vægi rökstuddra vísbendinga sem lá til grundvallar rannsókninni *í lífi*.

Prófunaríðefni:

— efni með einum efnisþætti: 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, blöndur og UVCB-efni: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegum eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli,

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,

— meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,

— geymsluskilyrði.

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,

— fjöldi dýra af hvoru kyni,

— þyngd hvers dýrs í upphafi og lok prófunar,

— aldur í upphafi rannsóknar,

— uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

— aðferð við undirbúning svæðis fyrir grisjuplástra,

— upplýsingar um grisjuefnin og aðferð við plástrun,

— upplýsingar um undirbúning prófunaríðefnisins og hvernig það er borið á og fjarlægt.

Niðurstöður:

— töflusetning stigagjafar fyrir ertingar- eða ætingarsvörun fyrir hvert dýr á hverjum athugunartíma,

— lýsing á öllum vefjaskemmdum sem komu fram,

— lýsing í samfelldu máli á eðli og umfangi þeirrar ertingar eða ætingar, sem kom fram, og vefmeinafræðilegar niðurstöður,

— lýsing á öðrum skaðlegum, staðbundnum áhrifum (s.s. minnkun húðfitu) og altækum áhrifum til viðbótar við húðertingu eða húðætingu.

Umfjöllun um niðurstöður

Ályktanir

HEIMILDIR

1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/ Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tafla

Flokkun húðviðbragða

Hörundsroði og brunaskorpumyndun

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

Hámarksgildi: 4

Bjúgmyndun

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

Hámarksgildi: 4

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

Viðbætir

SKILGREININGAR

Íðefni: efni eða blanda.

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

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

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

2) Í stað kafla B.17 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.17 **PRÓFUN Í GLASI Á GENASTÖKKBREYTINGUM Í SPENDÝRAFRUMUM MEÐ HPRT- OG XPRT-GENUM**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 476 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þörfum á nýrri löggjöf og velferð dýra. Þessi núgildandi endurskoðaða útgáfa af prófunaraðferð B.17 endurspeglar næstum þrjátíu ára reynslu af þeirri prófun og einnig niðurstöður úr þróun á sérstakri nýrri aðferð fyrir prófun *í glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum með týmidínkínasa-geninu. Prófunaraðferð B.17 er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).

2. Tilgangur prófunar *í glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum er að greina stökkbreytingar sem íðefni kalla fram. Frumulínurnar sem eru notaðar í þessum prófunum mæla frumstökkbreytingar í vísigenum, einkum í innræna hýpóxantín-gúanínfosfóríbósýltransferasageninu (Hprt í frumum úr nagdýrum, HPRT í frumum úr mönnum, sem vísað er til í heild sinni sem Hprt-genið og HPRT-prófunin í þessari prófunaraðferð), og aðflutt gen fyrir xantín-gúanínfosfóríbósýltransferasa (gpt) (sem vísað er til sem XPRT-prófun). HPRT- og XPRT-stökkbreytingaprófanirnar greina mismunandi róf erfðafræðilegra atburða. Auk stökkbreytingar sem HPRT-prófunin greinir (t.d. basaparaskipti, fasabreytingar, litlar úrfellingar og innskot) getur staðsetning aðflutta gensins fyrir gpt á A-litningi gert kleift að greina stökkbreytingar sem stafa af miklum úrfellingum og hugsanlegri endurröðun í jafnskiptingu sem greinist ekki með HPRT-prófuninni því Hprt-genið er staðsett á X-litningnum (2.–7. heimild). Sem stendur er XPRT-prófunin minna notuð en HPRT-prófunin í eftirlitsskyni.

3. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

4. Prófanir, sem eru gerðar *í glasi*, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja *í lífi*.

5. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem myndu leiða til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, (þ.e. hugsanleg víxlverkun við prófunarkerfið) sem eru ekki vegna beinna verkana milli prófunaríðefnanna og erfðaefnis frumunnar; meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk (8.–10. heimild), verkanir milli efnisþátta í ætinu (11. og 12. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (13. heimild). Frumueiturhrif sem fara yfir ráðlögðu hæstu frumueiturhrifagildin, eins og þau eru skilgreind í 19. lið, teljast of mikil fyrir HPRT-prófunina.

6. 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

7. Stökkbreyttar frumur sem skortir Hprt-ensímvirkni í HPRT-prófuninni eða xprt-ensímvirkni í XPRT-prófuninni eru þolnar gagnvart frumuhemjandi áhrifum púrínhliðstæðunnar 6-þíógúaníns (TG). Frumur með Hprt (í HPRT-prófuninni) eða gpt (í XPRT-prófuninni) eru næmar gagnvart TG sem hindrar efnaskipti frumna og stöðvar frekari frumuskiptingu. Stökkbreyttar frumur eru því færar um að fjölga sér ef TG er í umhverfi þeirra en það geta eðlilegar frumur ekki sem eru með Hprt-ensím (í HPRT-prófuninni) eða gpt-ensím (í XPRT-prófuninni).

8. Frumur í svifblöndu- eða einlagsrækt eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu í hæfilegan tíma (3–6 klst), bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar (sjá 14. lið), og síðan afræktaðar til þess að ákvarða frumueiturhrif og láta svipfarstjáningu koma fram áður en stökkbrigðin eru valin (14.–17. heimild). Frumueiturhrif eru ákvörðuð með hlutfallslegri lifun (RS), þ.e. klónunarhæfni sem mæld er strax eftir meðhöndlun og leiðrétt með öllu frumutapi í meðhöndlun borið saman við neikvæðan samanburð (18. liður og 2. viðbætir). Meðhöndluðu ræktirnar eru látnar vera í vaxtarætinu í hæfilegan tíma, sem er miðaður við frumugerðina, þannig að svipfarstjáning framkallaðra stökkbreytinga verði því sem næst í hámarki (yfirleitt minnst í 7–9 daga). Eftir að svipfarstjáning er komin fram er tíðni stökkbrigða ákvörðuð með því að sá þekktum fjölda frumna á æti, sem inniheldur valvísa efnið, í því skyni að finna stökkbreyttar þyrpingar og á æti, sem er án valvísa efnisins, til að ákvarða klónunarhæfnina (lífvænleikann). Eftir ræktun í hæfilega langan tíma eru þyrpingarnar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðrétt með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Frumur

9. Fyrir skal liggja staðfesting á því að frumugerðirnar, sem notaðar eru í HPRT- og XPRT-prófunum, séu næmar gagnvart efnafræðilegum stökkbreytivöldum, þær hafi mikla klónunarhæfni, stöðuga kjarngerð og hlutfall sjálfsprottinna stökkbrigða sé stöðugt. Frumurnar sem algengast er að nota í HPRT-prófun eru frumulínurnar CHO, CHL og V79 úr kínahamstri, eitilæxlisfrumur músa, L5178Y, og TK6 sem eru eitlakímfrumur úr mönnum (18. og 19. heimild). AS52-frumur með uppruna í CHO-frumulínu og innihalda aðflutta gpt-genið (og þar sem Hprt-genið hefur verið fjarlægt) eru notaðar í XPRT-prófunina (20. og 21. heimild); ekki er hægt að gera HPRT-prófunin á AS52-frumum því hprt-genið hefur verið fjarlægt. Notkun á öðrum frumulínum skal rökstyðja og fullgilda.

10. 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 (22. og 23. 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 sem er notaður í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefnu frumueiginleikana. Einnig skal athuga tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða í viðmiðunarfrumustofninum og ekki skal nota stofninn ef tíðni stökkbrigða er óásættanlegt.

11. Áður en ræktirnar eru notaðar í þessa prófun kann að vera nauðsynlegt að fjarlægja stökkbreyttar frumur sem eru þegar til staðar í ræktunum, t.d. með ræktun í HAT-æti fyrir HPRT-prófun og MPA-æti fyrir XPRT-prófun (5. og 24. heimild) (sjá 1. viðbæti). Hægt er að geyma hreinsuðu frumurnar í frosti og síðan afþíða þær og nota sem vinnslustofna. Hægt er að nota vinnslustofninn, sem hefur nýlega verið afþíddur, í prófunina eftir að venjulegum tvöföldunartímum er náð. Þegar XPRT-prófunin er gerð skal venjubundin ræktun AS52-frumna vera við skilyrði sem tryggja að aðflutta gpt-geninu verði viðhaldið (20. heimild).

Æti og ræktunarskilyrði

12. Nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (ræktunarílát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO2 og ræktunarhitastig við 37 °C) til að viðhalda frumum í rækt. Frumuræktum skal ávallt viðhaldið við skilyrði sem tryggja að þær vaxi í veldisvaxtarfasa. Sérstaklega er mikilvægt að æti og ræktunarskilyrðin séu valin þannig að vöxtur frumna á tjáningartímanum og ákjósanleg klónunarhæfni, bæði stökkbreyttra og óbreyttra frumna, verði í hámarki.

Undirbúningur ræktа

13. Frumulínum úr stofnræktum er fjölgað, sáð í ræktunaræti í hæfilegum þéttleika til að frumur í sviflausnum eða einlögum haldi áfram í veldisvexti á meðhöndlunar- og tjáningartímanum (t.d. ætti að forðast samrennsli frumna sem vaxa í einlögum).

Efnaskiptavirkjun

14. 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 (25.–28. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og β-naptóflavóns (29.–32. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (33. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að framkalla oxídasa sem gegna mismunandi hlutverki (29. og 31. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1 til 2% að rúmmálshlutfalli en má auka upp í 10% í síðasta prófunaræetinu. Flokkur efnanna sem verið er að prófa getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður (34.–36. heimild).

Tilreiðsla prófunaríðefnis

15. Prófunaríðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar (sjá 16. 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 (37. og 38. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

PRÓFUNARSKILYRÐI

Leysar

16. Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefna án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunarinnar, 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 ræktunaræti). Vel þekktir leysar eru t.d. vatn og 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 leysarnir sem eru notaðir eru ekki vel þekktir (t.d. etanól eða aseton) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þeir séu samrýmanlegir við prófunaríðefnin og prófunarkerfið og hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkleikann sem er notaður. Ef þessi gögn til stuðnings liggja ekki fyrir er mikilvægt að bæta við ómeðhöndluðum samanburði (sjá 1. viðbæti) til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, valdi hvorki skaðlegum né stökkbreytandi áhrifum.

Mælingar á frumueiturhrifum og val á styrk váhrifa

17. 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 20. lið), útfellingu í ræktunarætinu (sjá 21. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 5. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í ætinu þegar því er bætt í það skal stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarætið þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.

18. Val á styrk byggir á frumueiturhrifum og öðrum atriðum (sjá 20.–22. lið). Ekki er krafist upphafsprófunar en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsprófun verið gagnlegt til að skilgreina betur styrkleikana sem á að nota í aðaltilrauninni. Þótt frummat á frumueiturhrifum sé gert er enn krafist mælingar á frumueiturhrifum fyrir hverja ræktun í aðaltilrauninni. Meta skal frumueiturhrif með því að nota RS, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun, byggt á frumufjölda, samanborið við leiðrétta klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun) (sjá formúlur í 2. viðbæti).

19. Meta skal a.m.k. fjóra prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir er hægt að nota annað hvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Niðurstöður, sem fást úr óháðum samhliða ræktunum við tiltekinn styrkleika, skulu tilkynntar sérstaklega en þær er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna (17. heimild). 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 og til styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunaríðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að ná yfir allt svið frumueiturhrifa, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, getur verið nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og fleiri en fjóra styrkleika, einkum við þau skilyrði að endurtekin rannsókn er nauðsynleg (sjá 43. lið). Ef ein rækt er notuð getur verið sérstaklega mikilvægt að nota fleiri en fjóra styrkleika.

20. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% RS. Fara skal gætilega við túlkun á jákvæðum niðurstöðum sem koma aðeins fram í 10% RS eða undir (sjá 43. lið).

21. Hæsti greindi styrkleiki torleysanlegra prófunaríðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er undir lægstu leysanleikamörkum, 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. Það getur verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunarætinu fyrir tilraunina.

22. 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. og 40. heimild). Ef prófunaríðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni (þ.e. efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu (UVCB-efni)) (41. 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 (42. heimild).

Samanburðir

23. Fyrir hvert tilraunaskilyrði skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 16. lið), sem byggist á því að meðhöndlunarmiðillinn er eingöngu leysir sem fær sömu meðhöndlun og meðhöndluðu ræktirnar.

24. Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina stökkbreytivalda, 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 samanburðarefni ef það er stutt rökum. Þar eð prófanir *í glasi* á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumur eru nægilega staðlaðar má gera prófanir þar sem notuð er meðhöndlun með og án efnaskiptavirkjunar með eingöngu jákvæðum samanburði sem krefst efnaskiptavirkjunar. Í því tilviki sýnir þessi eina svörun með jákvæðri samanburðarprófun fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins. 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 og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í þessari prófunaraðferð (sjá 20. lið).

Tafla 1

Viðmiðunarefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði

Skilyrði við efnaskiptavirkjun	Genasæti	Efni og CAS-nr.
Engin útræn efnaskiptavirkjun	*Hprt*	Etýlmetansúlfónat [CAS-nr. 62-50-0] Etýlnítrósóúrea [CAS-nr. 759-73-9] 4-nítrókínólín-1-oxíð [CAS-nr. 56-57-5]
	xprt	Streptónígrín [CAS-nr. 3930-19-6] Mítómýsín C [CAS-nr. 50-07-7]
Útræn efnaskiptavirkjun	*Hprt*	3-metýlkólantren [CAS-nr. 56-49-5] 7,12-dímetýlbensantrasen [CAS-nr. 57-97-6] Bensó[a]pýren [CAS-nr. 50-32-8]
	xprt	Bensó[a]pýren [CAS-nr. 50-32-8]

VERKFERLI

Meðhöndlun með prófunaríðefni

25. Frumur, sem eru í fjölgunarferli, eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu, bæði með efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Beita skal váhrifum í hæfilegan tíma (venjulega eru þrjár til sex klukkustundir fullnægjandi).

26. Lágmarksfjöldi frumna sem er notaður fyrir hverja prófunarræktun (samanburður og meðhöndlun) á hverju stigi prófunarinnar, er ákveðinn með tilliti til tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða. Almenna viðmiðunarreglan er að fjöldi meðhöndlaðra frumna og umsáninga sé nógu mikill til að viðhalda 10 sjálfsprottnum stökkbrigðum í hverri rækt á öllum stigum prófunarinnar (17. heimild). Tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða er að jafnaði milli 5 og 20×10^{-6}. Til að tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða sé 5×10^{-6} og til að viðhalda nægilegum fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri), jafnvel fyrir ræktir sem eru meðhöndlaðar með styrkleika sem valda 90% frumueiturhrifum á meðan á meðhöndlun stendur (10% RS), er nauðsynlegt að meðhöndla a.m.k. 20×10^{6} frumur. Auk þess þarf að rækta nægilegan fjölda frumna (aldrei færri en 2 milljón) á tjáningartímanum og sá fyrir val á stökkbrigðum.

Svipfarstjáningartími og mæling á tíðni stökkbrigða

27. Eftir meðhöndlunartímann eru frumurnar ræktaðar til að gera þeim kleift að tjá svipfar stökkbrigðisins. Að jafnaði nægja minnst 7 til 9 dagar til þess að svipfarstjáning nýlega framkallaðra Hprt- og xprt-stökkbrigða verði því sem næst í hámarki. Á þessu tímabili eru frumur reglulega afræktaðar til að viðhalda veldisvexti þeirra. Eftir svipfarstjáningu er frumum endursáð í æti með og án valvísa efnisins (6-þíógúanín) til að annars vegar ákvarða fjölda stökkbrigða og hins vegar klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin. Hægt er að framkvæma sáninguna í skálum fyrir einlaga ræktir eða örtítrunarbökkum fyrir frumur í sviflausn. Fyrir val á stökkbrigðum skal sá frumum þétt til að tryggja bestu endurheimt stökkbrigða (þ.e. forðast efnaskiptasamvinnu) (17. heimild). Bakkarnir eru hafðir í ræktun hæfilega lengi (t.d. í 7–12 daga) fyrir hámarksvöxt þyrpinga, og þyrpingar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðréttur með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin (sjá formúlur í 2. viðbæti).

Hæfni rannsóknarstofunnar

28. Rannsóknarstofan skal framkvæma röð tilrauna með jákvæðum viðmiðunarefnum í mismunandi gangvirkjum (að lágmarki eitt virkt með og eitt virkt án efnaskiptavirkjunar sem eru valin úr efnunum sem eru skráð í töflu 1) og mismunandi neikvæðum samanburðum (með mismunandi leysum/burðarefnum) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af prófuninni 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 30.–33. lið.

29. Kanna skal nokkur valin jákvæð samanburðarefni (sjá töflu 1 í 25. lið) án og með efnaskiptavirkjun til að sýna fram á hæfni við greiningu á stökkbreytandi íðefnum, ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og sýna fram á hversu viðeigandi skilyrðin til frumuvaxtar eru meðan á meðhöndlun stendur, við svipfarstjáningu og við val á stökkbrigðum og hversu viðeigandi talningaraðferðirnar eru. Velja skal styrksvið völdu efnanna þannig að það fáist samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

30. Rannsóknarstofan skal ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (ómeðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.

31. Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt viðmiðunargögn (22. heimild). Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburðadreifingar (17., 45. og 46. heimild).

32. 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“ (47. 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 (46. 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 45. heimild.

33. Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni stökkbrigða úr stakri rækt eða helst samhliða ræktum, eins og lýst er í 23. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburða-dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (17., 45. og 46. 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 hér að framan) og engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.

34. 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 OG SKÝRSLUGJÖF

Framsetning niðurstaðna

35. Framsetning niðurstaðna skal innihalda öll þau gögn sem þarf til að reikna út frumueiturhrif (gefin upp sem RS). Gögnin fyrir bæði meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir skulu innihalda fjölda frumna í lok meðhöndlunar, fjölda frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni og fjölda þyrpinga (eða fjölda hola án þyrpinga ef um er að ræða örtítrunaraðferðina). RS fyrir hverja rækt skal gefið upp sem hlutfall samskeiða samanburða með leysi (sjá skilgreiningar í I. viðbæti).

36. Framsetning niðurstaðna skal einnig innihalda öll þau gögn sem þarf til að reikna út tíðni stökkbrigða. Gögn fyrir bæði meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir skulu innihalda: 1) fjölda frumna sem sáð er með og án valvísa efnisins (þegar frumunum er sáð fyrir val á stökkbrigðum) og 2) fjölda þyrpinga sem taldar eru (eða fjölda hola án þyrpinga ef um er að ræða örtítrunaraðferð) af bökkunum með og án valvísa efnisins. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga (á bökkunum með valvísa efninu) sem er leiðréttur með klónunarhæfni (af bökkunum án valvísa efnisins). Tíðni stökkbrigða skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna á hverja milljón lífvænlegra frumna (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti).

37. Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

38. 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 33. lið.

— Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 24. 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.

— Tvenn tilraunaskilyrði (þ.e. með og án efnaskiptavirkjunar) voru prófuð nema eitt þeirra hafi gefið jákvæðar niðurstöður (sjá 25. lið).

— Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika er greinanlegur (25., 26. og 19. liður).

— Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta styrkleika eru í samræmi við það sem lýst er í 20., 21. og 22. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

39. 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, ef:

— að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— aukningin er styrktengd í mati með viðeigandi leitniprófun,

— einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 33. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið genastökkbreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í 46. og 48. heimild.

40. 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:

— enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin styrktengd 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 33. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið genastökkbreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi.

41. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

42. 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 gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði (t.d. styrkleikabil, önnur skilyrði við efnaskiptavirkjun [þ.e. styrk eða uppruna S9]).

43. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir. Því er ályktað að svörun prófunaríðefnisins sé tvíræð (túlkuð þannig að hún er jafnlíkleg til að vera jákvæð eða neikvæð).

Prófunarskýrsla

44. 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 ræktunarætinu 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 lokaræktunaræti.

Frumur:

Fyrir móðurræktir á rannsóknarstofu:

— gerð, uppruni frumulína,

— fjöldi umsáninga, ef hann liggur fyrir, og rannsóknarstofusaga,

— einkenni kjarngerðarinnar og/eða eðlilegur fjöldi litninga

— aðferðir til að viðhalda frumuræktum,

— upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum,

— tvöföldunartími frumna.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda ræktа sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,

— samsetning ræktunarætis, styrkur CO_2, rakastig,

— styrkleiki prófunaríðefnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarætinu (t.d. í µg eða mg/ml eða mM af ræktunaræti),

— styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðefnis sem er bætt í ræktunarætið,

— ræktunarhiti,

— ræktunartími,

— lengd meðhöndlunar,

— þéttleiki frumna við meðferð,

— gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarætinu, gæðaeftirlit með S9),

— jákvæð og neikvæð samanburðarefni, lokastyrkleiki við öll meðhöndlunarskilyrði,

— lengd tjáningartíma (m.a. fjöldi frumna sem er sáð, undirræktir og áætlanir um næringargjöf, ef við á),

— auðkenni valvísa efnisins og styrkleikur þess,

— viðmiðanir fyrir ásættanleika prófana,

— aðferðir sem eru notaðar til að finna fjölda lífvænlegra og stökkbreyttra frumna,

— aðferðir sem eru notaðar við mælingar á frumueiturhrifum,

— allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,

— tímalengd ræktunar eftir sáningu,

— 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 frumna í hverri rækt sem eru meðhöndlaðar og fjöldi frumna í hverri rækt sem eru afræktaðar,

— mælingar á frumueiturhrifum og aðrar athuganir ef þær eru gerðar,

— merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,

— fjöldi frumna sem er sáð í æti með valvísa efninu og í æti sem er ekki með valvísa efninu,

— fjöldi þyrpinga í ætinu með valvísa efninu og fjöldi þyrpinga í ætinu sem er ekki með valvísa efninu, og tengd tíðni stökkbrigða,

— 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 öryggisbili (t.d. 95%), sem og fjöldi gagna,

— tölfræðilegar greiningar (fyrir stakar ræktir og safnsýni samhliða prófunar, ef við á) og p-gildi ef þau liggja fyrir.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstaða

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) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (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 Res., 634, 177-183.

13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (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 Res., 5841–256.

14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, bls. 66-101.

18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Handrit í vinnslu).

23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (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 Res., 37, 83-90.

26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Í: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, bls. 85-88.

31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

33) UNEP. (2001). Stokkhólmssamningur um þrávirk lífræn efni, Umhverfisstofnun Sameinuðu þjóðanna. Að-gengilegt á: [http://www.pops.int.html].

34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Í: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, bls. 91-103.

38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

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 (Viðmiðunarreglur 473, 476 og 487 um prófanir). Aðgengilegt samkvæmt beiðni hjá Efnahags- og framfarastofnuninni.

40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

42) 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].

43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, bls. 141–154.

48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Stökkbreytivaldur sem veldur basaskiptum: íðefni sem valda því að skipti verða á basapörum í DNA-sameindinni.

Íðefni: efni eða blanda.

Klónunarhæfni: Hlutfall frumna sem er sáð í litlum þéttleika og geta vaxið til að mynda þyrpingu sem hægt er að telja.

Styrkleiki: vísar til lokastyrkleika prófunaríðefnisins í ræktunarætinu.

Frumueiturhrif: Að því er varðar rannsóknir sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem minnkun hlutfallslegrar lifunar hjá meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá viðeigandi lið).

Frumstökkbreyting: genastökkbreyting frá foreldragerð í stökkbrigði sem veldur því að ensímvirkni eða hlutverk táknaða prótínsins breytist eða glatast.

Fasabreytandi efni: íðefni sem valda því að eitt eða nokkur basapör bætast við í DNA-sameindinni eða falla brott úr henni.

Erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. DNA-rof, viðbætur, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir

HAT-æti: æti sem inniheldur hýpóxantín, amínópterín og týmidín, notað til að hreinsa Hprt-stökkbrigði.

Endurröðun í jafnskiptingu: endurröðun milli samstæðra litningsþráða meðan á mítósu stendur, leiðir hugsanlega til vakningar á rofi DNA-tvíþátta eða til taps á arfblendni.

MPA-æti: æti sem inniheldur xantín, adenín, týmidín, amínópterín og mýkófenólsýru, notað til að hreinsa Xprt-stökkbrigði.

Stökkbreyting: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Tíðni stökkbrigða: fjöldi stökkbreyttra þyrpinga sem greinast deilt með fjölda frumna sem er sáð í ætið með valvísa efninu, leiðrétt með klónunarhæfni (eða lífvænleika) þegar stökkbrigði eru valin.

Svipfarstjáningartími: Tíminn sem er liðinn frá meðhöndlun þegar erfðafræðilega breytingin er fest í genamenginu og allar genaafurðir sem fyrir eru hverfa þannig að svipfarseinkennin breytast.

Hlutfallsleg lifun (RS): RS er notuð sem mælikvarði á meðhöndlunartengd frumueiturhrif. RS er klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun).

S9-lifrarþættir: 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 ekki meðhöndlaðar (þ.e. hvorki með prófunaríðefni né leysi) en eru unnar samtímis og á sama hátt og ræktirnar sem prófunaríðefnið er sett í.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni

2. viðbætir

FORMÚLUR FYRIR MAT Á FRUMEITURHRIFUM OG TÍÐNI STÖKKBRIGÐA

Frumueiturhrif eru metin með hlutfallslegri lifun, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við leiðrétta klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun) (sjá formúluna fyrir hlutfallslega lifun hér á eftir)

Leiðrétt CE fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunaríðefni er reiknuð út sem:

$$\text{Leiðrétt CE} = \frac{\text{Fjöldi frumna í lok meðhöndlunar}}{\text{Fjöldi frumna við upphaf meðhöndlunar}}$$

RS fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunaríðefni er reiknuð út sem:

$$\text{RS} = \frac{\text{Leiðrétt CE í meðhöndlaðri rækt}}{\text{Leiðrétt CE í samanburði með leysi}} \times 100$$

Tíðni stökkbrigða er klónunarhæfni þyrpinga með stökkbreyttum frumum í ætinu með valvísa efninu deilt með klónunarhæfni í ætinu sem er ekki með valvísa efninu, mælt fyrir sömu rækt þegar stökkbrigði eru valin.

$$\text{Tíðni stökkbrigða} = \frac{\text{Klónunarhæfni þyrpinga með stökkbreyttum frumum í ætinu með valvísa efninu}}{\text{Klónunarhæfni í ætinu sem er ekki með valvísa efninu}}$$

Þegar bakkar eru notaðir fyrir klónunarhæfni:

CE = fjöldi þyrpinga / fjöldi frumna sem sáð er

Þegar örtítrunarbakkar eru notaðir fyrir klónunarhæfni:

Fjöldi þyrpinga í hverri holu á örtítrunarbökkum fylgir Poisson-dreifingu.

Klónunarhæfni = LnP(0) / fjöldi frumna sem er sáð í hverja holu

Ef -LnP(0) er hugsanlegur fjöldi tómra hola af þeim holum sem sáð var í og er lýst með eftirfarandi formúlu:

LnP(0) = -Ln (fjöldi tómra hola / fjöldi hola sem sáð var í)“

3) Í stað kafla B.22 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.22 **PRÓFUN Á RÍKJANDI BANAGENUM HJÁ NAGDÝRUM**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 478 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa á nýrri löggjöf og sjónarmiða er varða velferð dýra. Þessi breytta útgáfa af prófunaraðferðinni endurspeglar rúmlega þrjátíu ára reynslu af þeirri prófun og möguleikann á að samþætta þessa prófun eða sameina hana öðrum eiturhrifaprófunum s.s. rannsóknum á þroska, eiturhrifum á æxlun eða erfðaeiturhrifum; vegna takmarkana prófunarinnar og notkunar á miklum fjölda dýra er þessi greining þó ekki ætluð sem meginaðferð heldur frekar sem viðbótarprófunaraðferð sem skal aðeins nota ef enginn annar staðgöngukostur er fyrir hendi m.t.t. krafna samkvæmt reglum. Með því að sameina eiturhrifaprófanir er hægt að hlífa miklum fjölda dýra við notkun í eiturhrifaprófunum. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).

2. Tilgangurinn með prófun á ríkjandi banagenum er að rannsaka hvort íðefni kalla fram stökkbreytingar sem verða vegna litningabreytinga í kímfrumum. Auk þess hentar prófun á ríkjandi banagenum til að meta erfðaeiturhrif 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. Ef ríkjandi banvæn stökkbreyting kemur fram eftir váhrif frá prófunaríðefni bendir það til þess að íðefnið hafi haft áhrif á kímvef tilraunadýrsins.

3. Ríkjandi banvænar stökkbreytingar leiða til dauða fósturvísis eða fósturs. Ef ríkjandi banvæn stökkbreyting kemur fram eftir váhrif frá prófunaríðefni bendir það til þess að íðefnið hafi haft áhrif á kímfrumur tilraunadýrsins.

4. Greining á ríkjandi banagenum er gagnleg til staðfestingar á jákvæðum niðurstöðum úr prófunum þar sem notaðir eru líkamsendapunktar *í lífi* og er mikilvægur endapunktur til að spá fyrir um áhættu fyrir menn og áhættu á erfðasjúkdómum sem berast gegnum kímlínuna. Þessi greining krefst þó mikils fjölda dýra og mikillar vinnu og er þar af leiðandi afar kostnaðarsöm og tímafrek í framkvæmd. Þar eð tíðni sjálfsprottinna ríkjandi banvænna stökkbreytinga er mjög há er næmi greiningarinnar til að greina litla aukningu í tíðni stökkbreytinga almennt takmörkuð.

5. Skilgreiningar á lykilhugtökum eru settar fram í 1. viðbæti.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

6. Prófunin er oftast gerð á músum (2.–4. heimild) en í sumum tilvikum gæti átt við að nota aðrar tegundir s.s. rottur (5.–8. heimild) ef fyrir því eru vísindaleg rök. Ríkjandi banagen koma yfirleitt til vegna mikilla litningabreytinga (breytinga á byggingu og fjölda litninga) (9.–11. heimild), en ekki er hægt að útiloka genastökkbreytingar. Ríkjandi banvæn stökkbreyting er stökkbreyting sem verður í kímfrumunni sem slíkri, eða í ungum fósturvísi eftir frjóvgun, sem veldur ekki truflun á starfsemi kynfrumanna en er banvæn fyrir frjóvguð egg eða fósturvísi sem er að þroskast.

7. Karldýrin eru pöruð raðbundið hvert fyrir sig með kvendýrum, sem hafa aldrei fengið fang (e. *virgin female*), með hæfilegum millibilum. Fjöldi parana eftir meðferð fer eftir endanlegum tilgangi rannsóknarinnar á ríkjandi banagenum (23. liður) og skal tryggja að öll stig þroskunar kímfrumna karldýra séu metin að því er varðar ríkjandi banagen (12. heimild).

8. Þessi prófun hentar ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunaríðefnið eða umbrotsefni þess nái ekki út í eistu.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

9. Venjulega eru karldýr látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og pöruð við ómeðhöndluð kvendýr sem hafa aldrei fengið fang. Hægt er að prófa ólík kímfrumustig með því að nota raðbundin pörunartímabil. Kvendýrin eru aflífuð að hæfilegum tíma liðnum eftir pörun og leg þeirra rannsökuð til að ákvarða fjölda fanga og lifandi og andvana fósturvísa. Ríkjandi banvæni prófunaríðefnis er ákvarðað með því að bera saman lifandi föng á hvert kvendýr í meðferðarhópnum og lifandi föng á hvert kvendýr í samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi. Fjölgun dauðra fanga á hvert kvendýr í meðferðarhópnum, miðað við fjölda dauðra fanga á hvert kvendýr í samanburðarhópnum, endurspeglar fanglát eftir hreiðrun af völdum prófunaríðefnisins. Fanglát eftir hreiðrun er reiknað út með því að ákvarða hlutfallið milli dauðra fanga og heildarfjölda fanga í meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga í samanburðarhópnum. Hægt er að meta fanglát fyrir hreiðrun með því að bera saman fjölda gulbúa að frádregnum heildarfjölda fanga eða heildarfjölda fanga á hvert kvendýr í meðferðar- og samanburðarhópunum.

SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

10. Til að staðfesta hæfi til að framkvæma þessa greiningu skal sýna fram á getu til að endurtaka tíðni ríkjandi banagena út frá útgefnum gögnum (t.d. 13.–18. heimild) með jákvæðum samanburðarefnum (þ.m.t. veikar svaranir), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1, og með samanburði með burðarefni, og fá fram tíðni neikvæðra samanburða sem er í samræmi við viðunandi gagnasvið (sjá tilvísanir hér að framan) eða með rannsóknarsögulegri dreifingu samanburða hjá viðkomandi rannsóknarstofu, ef hún liggur fyrir.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Val á dýrategund

11. Nota skal heilbrigð, kynþroska dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Algengt er að nota mýs en einnig getur átt við að nota rottur. Heimilt er að nota aðrar heppilegar tegundir spendýra ef sett eru fram vísindaleg rök í skýrslunni.

Aðbúnaður dýra og fóðrun

12. Að því er varðar nagdýr 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. Fyrir meðferð eða pörun skulu nagdýr vera í búri í litlum hópum (ekki fleiri en fimm saman) af sama kyni ef árásargirni er ekki vænst eða hún kemur ekki fram, helst í traustum búrum með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega vera hvert í sínu búri ef fyrir því liggja vísindaleg rök.

Undirbúningur dýranna

13. Heilbrigðum og kynþroska fullvöxnum karl- og kvendýrum er 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 afklippingu táa og mörkun eyrna) 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, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

Tilreiðsla skammta

14. 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

15. Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki 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.

Jákvæðir samanburðir

16. Ávallt skal nota dýr í samskeiða jákvæðum samanburði nema ef rannsóknarstofan hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur notað prófunina venjubundið nýlega (t.d. síðastliðin fimm ár). Þó er ekki nauðsynlegt að meðhöndla dýr í jákvæðum samanburði með sömu íkomuleið og dýr sem fá prófunaríðefnið eða að taka sýni á öllum pörunartímabilum. Jákvæðu samanburðarefnin skulu vera þekkt fyrir að framkalla ríkjandi banagen við skilyrðin sem notuð eru í prófuninni. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í meðferðarhópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð.

17. Velja skal skammtastærðir jákvæðu samanburðarefnanna með tilliti til þess að framkalla væg eða meðalsterk áhrif sem gera kleift að meta frammistöðu og næmleika greiningarinnar á gagnrýninn hátt, en framkalla stöðugt jákvæð ríkjandi, banvæn áhrif. Dæmi um jákvæð samanburðarefni og viðeigandi skammta er að finna í töflu 1.

Tafla 1

Dæmi um jákvæð samanburðarefni.

Efni [CAS-nr.] (tilvísunarnúmer)	Skilvirkt skammtasvið (mg/kg) (nagdýrategund)	Inngjafartímabil (dagar)
Tríetýlenmelamín [15-18-3](15. heimild)	0,25 (mýs)	1
Sýklófosfamíð [50-18-0] (19. heimild)	50–150 (mýs)	5
Sýklófosfamíð [50-18-0] (5. heimild)	25–100 (rottur)	1
Etýlmetansúlfónat [62-50-0] (13. heimild)	100–300 (mýs)	5
Einliðuakrýlamíð [79-06-1] (17. heimild)	50 (mýs)	5
Klórambúsíl [305-03-3] (14. heimild)	25 (mýs)	1

Neikvæðir samanburðir

18. Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með dýr í neikvæðum samanburði sem eru meðhöndluð einvörðungu með leysi eða burðarefni og að öðru leyti meðhöndluð á sama hátt og meðferðarhóparnir (20. heimild). Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki ríkjandi banagen eða önnur skaðleg áhrif skal einnig hafa með ómeðhöndluð samanburðardýr í hvert skipti sem sýni eru tekin, til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

VERKFERLI

Fjöldi dýra

19. Karldýrin eru pöruð raðbundið hvert fyrir sig, með fyrir fram ákveðnum hæfilegum millibilum (t.d. vikulega, 21. og 23. liður), helst með kvendýri sem hefur aldrei fengið fang. Fjöldi karldýra á hvern hóp skal ákveðinn fyrir fram til að hann sé nægilegur (ásamt fjölda paraðra kvendýra á hverju pörunartímabili) til að tryggja nauðsynlegan tölfræðilegan styrk til að greina minnst tvöföldun í tíðni ríkjandi banagena (44. liður).

20. Fjöldi kvendýra á hverju pörunartímabili skal einnig fyrir fram ákveðinn með útreikningum á tölfræðilegum styrk til að gera kleift að greina minnst tvöföldun í tíðni ríkjandi banagena (þ.e. nógu mörg kvendýr með fangi til að föngin séu a.m.k. 400 í heild) (20.–23. heimild) og búist sé við minnst einu dauðu fangi á hverja greiningareiningu (þ.e. pörunarhópur á hvern skammt) (24. heimild).

Inngjafartímabil og pörunartímabil

21. Fjöldi pörunartímabila eftir meðferð stjórnast af meðferðaráætluninni og skal tryggja að öll stig þroskunar kímfrumna karldýra séu metin að því er varðar vakningu ríkjandi banagena (12. og 25. heimild). Fyrir staka meðferð með allt að fimm daglegum skammtagjöfum skal framkvæma 8 (mýs) eða 10 (rottur) paranir með viku millibili eftir síðustu meðferð. Þegar margir skammtar eru gefnir má fækka pörunartímabilum í hlutfalli við lengra skömmtunartímabil, svo fremi sem enn sé unnt að meta öll stig sæðismyndunar (t.d. nægja fjórar vikulegar paranir til að meta öll stig sæðismyndunar í músum eftir 28 daga váhrifatímabil). Allar meðferðar- og pörunaráætlanir skulu studdar vísindalegum rökum.

22. Kvendýr eru höfð hjá karldýrum á tímabili sem svarar til lengdar minnst eins gangferils (t.d. nær ein vika yfir einn gangferil hjá bæði músum og rottum). Kvendýr sem pöruðust ekki á vikutímabili má nota á næsta pörunartímabili. Að öðrum kosti þar til pörun hefur átt sér stað, sem sjá má af sæði í leggöngum eða tilvist leggangatappa.

23. Váhrifa- og pörunaráætlunin fer eftir endanlegum tilgangi rannsóknarinnar á ríkjandi banagenum. Ef markmiðið er að ákvarða hvort íðefni sem er gefið kalli fram ríkjandi banvæna stökkbreytingu eitt og sér væri viðurkennda aðferðin að láta heilan sæðismyndunarferil (t.d. 7 vikur hjá músum, 5–7 meðferðir á viku) verða fyrir váhrifum og pörun ætti að fara fram einu sinni í lokin. Ef markmiðið er hins vegar að greina þá kímfrumugerð sem er næm fyrir ríkjandi banvænum stökkbreytingum eru váhrif í eitt skipti eða í fimm daga og síðan vikulegri pörun ákjósanlegri.

Skammtastærðir

24. Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir, sem gagnast við val á skömmtum, og forprófun til að ákvarða skammtastærðir er framkvæmd skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni, kyni og meðferðaráætlun og á að nota í meginrannsókninni (26. 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. óeðlilegt atferli eða óeðlileg viðbrögð, minni háttar þyngdartap eða frumueiturhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi), en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun á mannúðlegan hátt nauðsynlega (27. heimild).

25. Hámarksþolsskammtur má heldur ekki hafa skaðleg áhrif á það hvernig tókst til við pörunina (21. heimild).

26. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða prófunaríðefni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og ræsar) og íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.

27. 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 um er að ræða íðefni sem eru ekki eitruð er háskammturinn fyrir inngjafartímabil sem er 14 dagar eða lengra 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag og fyrir inngjafartímabil sem er styttra en 14 dagar er háskammturinn 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag.

Gjöf skammta

28. Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, undir húð, í bláæð, staðbundnar, með innöndun, um munn (með magafóðrun) 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 pörunar sé nægilegt til að hægt sé að greina áhrifin (31. liður). Hámarksrúmmál vökva sem hægt er að gefa í einu með magafóðrun eða innsprautun ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti alla jafna ekki að vera meira en 1 ml/100g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g. Ef meira rúmmál en það er notað (ef löggjöf um velferð dýra heimilar það) skal það rökstutt. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkleikann til að tryggja stöðugt rúmmál í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

Athuganir

29. Gera skal almennar, klíniskar 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 rannsóknarinnar og a.m.k. vikulega meðan á rannsóknum með endurteknum skömmtum stendur og við aflífun. Mæla skal 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 áður en prófunartímabilinu lýkur (27. heimild).

Vefjasöfnun og vinnsla á vef

30. Kvendýrin eru aflífuð á seinni helmingi meðgöngu á 13. degi meðgöngu að því er varðar mýs og á 14.–15. degi meðgöngu að því er varðar rottur. Leg eru rannsökuð vegna ríkjandi banvænna áhrifa til að ákvarða fjölda fanga, lifandi og andvana fósturvísa og gulbúa.

31. Leghorn og eggjastokkar eru afhjúpuð til að telja gulbú og fóstur eru fjarlægð, talin og vigtuð. Þess skal gætt að rannsaka legið vegna fósturvisnunar, sem lifandi fóstur skyggja á, og tryggja að öll fósturvisnun sé tilgreind. Dánartíðni fóstra skal skráð. Einnig skal skrá fjölda kvendýra með fangi og heildarfjölda hreiðrana, fanglát fyrir hreiðrun og dánarhlutfall eftir hreiðrun (þ.m.t. snemmkomin og síðkomin fósturvisnun). Auk þess er hægt að geyma sjáanleg fóstur í Bouin-festiefni í a.m.k. tvær vikur og síðan rannsaka þau vegna stórvægilegrar ytri vansköpunar (28. heimild) til að fá viðbótarupplýsingar um áhrif prófunarefnis á æxlun og þroskun.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

32. Gögn skal setja fram í töfluformi til að sýna fjölda paraðra karldýra, fjölda kvendýra með fangi og fjölda kvendýra sem eru ekki með fangi. Niðurstöður úr hverri pörun eru skráðar sérstaklega ásamt auðkennum hvers karldýrs og kvendýrs. Pörunartímabil, skammtastærð fyrir meðhöndluð karldýr og fjöldi lifandi fanga og dauðra fanga skulu tilgreind fyrir hvert kvendýr.

33. Fanglát eftir hreiðrun er reiknað út með því að ákvarða hlutfallið milli dauðra fanga og heildarfjölda fanga úr meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga úr samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi.

34. Fanglát fyrir hreiðrun er reiknað út sem munurinn á fjölda gulbúa og fjölda hreiðraðra fanga eða sem fækkun á meðalfjölda hreiðraðra fanga á hvert kvendýr í samanburði við samanburðarparanir. Ef fanglát fyrir hreiðrun eru metin skal það skráð.

35. Stuðull fyrir ríkjandi banagen er áætlaður sem: (fanglát eftir hreiðrun/heildarfjöldi fanga á hvert kvendýr) × 100.

36. Greina skal frá gögnum um eiturhrif og klínísk einkenni (skv. 29. lið).

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

37. Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunar.

— Samskeiða neikvæður samanburður er í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð og rannsóknarsöguleg samanburðargögn rannsóknarstofunnar, ef þau liggja fyrir (sjá 10. og 18. lið).

— Samskeiða jákvæðir samanburðir vekja svaranir sem eru í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð eða rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um jákvæðan samanburð, ef hann liggur fyrir, og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við neikvæða samanburðinn (sjá 17. og 18. lið).

— Nægilegur heildarfjöldi fanga og skammta hefur verið greindur (20. liður).

— Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 24. og 27. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

38. Greina skal a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa til að fá nægjanleg gögn til að framkvæma greiningu á skammtasvörun.

39. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

— að minnsta kosti einn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— aukningin er skammtatengd í a.m.k. einu tilraunaskilyrðanna (t.d. vikulegt pörunartímabil) í mati með viðeigandi prófun, og

— einhver niðurstaðnanna lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið ríkjandi banvænar stökkbreytingar í kímfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í 44. lið; aðrar tölfræðiaðferðir sem eiga best við má einnig finna í 20.– 22., 24. og 29. heimild. Í tölfræðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á dýrið sem tilraunaeininguna.

40. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef:

— enginn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin skammtatengd aukning í neinum tilraunaskilyrðum, og

— allar niðurstöður lenda innan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið ríkjandi banvænar stökkbreytingar í kímfrumum tilraunadýranna.

41. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.

42. Ef svörunin er ekki greinilega neikvæð eða 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 með fyrirliggjandi tilraunargögnum s.s. athugun hvort jákvæð niðurstaða lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsöguleg gögn rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (30. heimild).

43. 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.

44. Í tölfræðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á karldýrið sem tilraunaeininguna. Þó að talningargögn (t.d. fjöldi fanga á hvert kvendýr) geti verið Poisson-dreifð og/eða hlutföll (t.d. hlutfall dauðra fanga) geti haft tvíliða dreifingu eru slík gögn oft of mikið dreifð (31. heimild). Til samræmis við það skal við tölfræðilega greiningu fyrst nota prófun vegna of lítillar eða of mikillar dreifingar með breytileikaprófunum eins og Cochran-tviliðubreytileikaprófun (32. heimild) eða C(α)-prófun Tarones vegna of mikillar tviliðudreifingar (31. og 33. heimild). Ef ekkert frávik frá tvíliðudreifingu greinist má gera prófun á leitni í hlutföllum fyrir allar skammtastærðir með Cochran-Armitage-leitniprófun (34. heimild) og á parasamanburði með samanburðarhópnum með nákvæmniprófun Fishers (35. heimild). Á sama hátt, ef ekkert frávik frá Poisson-dreifingu greinist, má gera prófun á leitni í talningu með Poisson-aðhvarfi (36. heimild) og á parasamanburð með samanburðarhópnum innan ramma Poisson-líkansins, með því að nota paraandstæður (36. heimild). Ef of lítil eða of mikil dreifing, sem telst marktæk, greinist er mælt með stikalausum aðferðum (23. og 31. heimild). Þar á meðal eru prófanir sem byggja á röðun, s.s. Jonckheere-Terpstra-leitniprófun (37. heimild) og Mann-Whitney-prófanir (38. heimild) fyrir parasamanburð með samanburðarhópnum sem fær burðarefni eða leysi, ásamt prófunum með umröðun, endursýnatöku eða handahófsúrtakanálgun fyrir samanburð á leitni og parasamanburð með samanburðarhópnum (31. og 39. heimild).

45. Jákvæð greining á ríkjandi banagenum veitir sönnun á erfðaeiturhrifum prófunaríðefnisins í kímfrumum meðhöndlaðra karldýra af prófunartegundinni.

46. Athugun á því hvort mæld gildi eru innan eða utan rannsóknarsögulegs sviðs fyrir samanburðinn getur verið til leiðbeiningar við mat á líffræðilegu mikilvægi svörunarinnar (40. heimild).

Prófunarskýrsla

47. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Samantekt.

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 að framan), 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:

— tegundir/stofn sem eru notuð og rökstuðningur fyrir því vali,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— aðferð til að auðkenna dýrin hvert um sig,

— að því er varðar skammtímarannsóknir: líkamsþyngd hvers karldýrs 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 skammtastærðarannsókninni,

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um tilreiðslu prófunaríðefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— rök fyrir vali á íkomuleið,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum í dýrum, þ.m.t. fyrir vefjameinafræði- eða blóðgreiningar og tíðni athugana og vigtunar á dýrum, ef þær liggja fyrir,

— 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,

— upplýsingar um umhverfisfjölbreytni í búrum,

— nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu,

— aðferð við verkjastillingu,

— aðferð við aflífun,

— verklag við einangrun og varðveislu vefja,

— uppruni og lotunúmer allra setta og hvarfmiðla (ef við á),

— aðferðir við ákvörðun á heildarfjölda ríkjandi banagena,

— pörunaráætlun,

— aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða að pörun hafi átt sér stað,

— aflífunartími,

— viðmiðanir til að kvarða áhrif ríkjandi banagena, þ.m.t. gulbú, föng, fósturvisnanir og fanglát fyrir hreiðrun, lifandi föng, dauð föng.

Niðurstöður:

— ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturhrif,

— líkamsþyngd karldýranna á meðferðar- og pörunartímabilum,

— fjöldi paraðra kvendýra,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— gögn um samskeiða neikvæðan samanburð og rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— gögn um samskeiða jákvæðan samanburð,

— gögn í töflum fyrir hverja móður, þ.m.t.: fjöldi gulbúa á hverja móður, fjöldi fanga á hverja móður, fjöldi fósturvisnanna og fangláta fyrir hreiðrun á hverja móður, fjöldi lifandi fanga á hverja móður, fjöldi dauðra fanga á hverja móður, þyngd fóstra,

— samantekt ofangreindra gagna fyrir hvert pörunartímabil og fyrir hvern skammt ásamt tíðni ríkjandi banagena,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktun.

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) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) bls. 235-334, Elsevier, Amsterdam

3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice. Mutation Res., 296: 143-156.

19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. Í Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, bls. 129–156.

20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. Í *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), bls. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.

38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Íðefni: efni eða blanda.

Gulbú: hormónaseytandi samsetning sem verður til í eggjastokknum þar sem eggbú hefur losað egg. Fjöldi gulbúa í eggjastokkunum samsvarar fjölda eggja sem voru losuð.

Ríkjandi banvæn stökkbreyting: stökkbreyting sem verður í kímfrumu, eða er fest að lokinni frjóvgun, og leiðir til dauða fósturvísis eða fósturs.

Frjósemishlutfall: fjöldi paraðra kvendýra með fangi miðað við heildarfjölda paraðra kvendýra.

Pörunartímabil: tímabilið milli loka váhrifa og pörunar meðhöndlaðra karldýra. Með því að stjórna þessu tímabili er hægt að meta efnafræðileg áhrif á mismunandi kímfrumugerðir. Á pörunartímabili músa, á 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. og 8. viku eftir lok váhrifa, eru mæld áhrif á sæði, þéttar forsæðisfrumur, hringlaga forsæðisfrumur, sáðfrumuvísa á 3. stigi prófasa rýriskiptingar, sáðfrumuvísa á fyrsta stigi, sérhæfðar sáðstofnfrumur, sáðstofnfrumur á sérhæfingarstigi (e. *differentiating*) og frjómóður-stofnfrumur.

Fanglát fyrir hreiðrun: munurinn á fjölda fanga og fjölda gulbúa. Einnig er hægt að áætla það með því að bera saman heildarfjölda fanga á hvert kvendýr í meðhöndlaða hópnum og samanburðarhópnum.

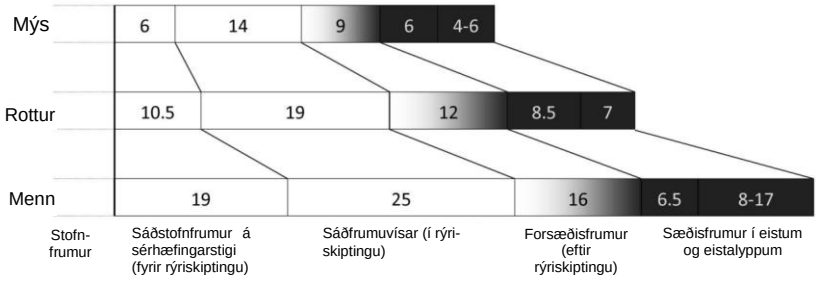
Fanglát eftir hreiðrun: hlutfallið milli dauðra fanga í meðferðarhópnum miðað við hlutfall dauðra fanga og heildarfjölda fanga í samanburðarhópnum.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

2. viðbætir

TÍMASETNINGAR SÆÐISMYNDUNAR HJÁ SPENDÝRUM



Mynd 1: Samanburður á tímalengd (í dögum) þroskunar karlkyns kímfrumna hjá músum, rottum og mönnum. DNA-viðgerð á sér ekki stað á þeim tímabilum sem eru skyggð.

Hér að framan er skýringarmynd af sæðismyndun hjá músum, rottum og mönnum (úr Adler, 1996). Ósérhæfðar sáðstofnfrumur eru m.a.: Sáðstofnfrumur sem eru A-stakar, A-pör og A-runur (Hess og de Franca, 2008). A-stakar sáðstofnfrumur teljast vera stofnfrumur og til að meta áhrif á stofnfrumur skulu þar af leiðandi líða a.m.k. 49 dagar (hjá músum) milli síðustu innsprautunar prófunaríðefnisins og pörunar.

Tilvísanir

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Í: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science Business Media:1-15.“

4) Í stað kafla B.23 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.23 **PRÓFUN Á LITNINGABREYTINGUM Í SÁÐSTOFNFRUMUM SPENDÝRA**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 483 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa á nýrri löggjöf og sjónarmiða er varða velferð dýra. Þessi breytta útgáfa af prófunaraðferðinni endurspeglar margra ára reynslu af þeirri greiningu og möguleikann á að samþætta þessa prófun eða sameina hana öðrum eiturhrifa- eða erfðaeiturhrifaprófunum. Með því að sameina eiturhrifarannsóknir er hægt að fækka dýrum sem eru notuð í eiturhrifaprófunum. Þessi prófunaraðferð er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (1. heimild).

2. Tilgangurinn með prófun *í lífi* á litningabreytingum í sáðstofnfrumum er að sanngreina hvort íðefni valdi byggingarlegum litningabreytingum í sáðstofnfrumum spendýra (2., 3. og 4. heimild). Auk þess hentar þessi prófun til að meta erfðaeiturhrif 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. Þessi prófunaraðferð er ekki ætluð fyrir mælingu á frávikum á fjölda; þessi greining er að jafnaði ekki notuð í þeim tilgangi.

3. Með þessari prófun er unnt að greina byggingarlegar litningabreytingar (bæði í litningum og litningsþráðum) í sáðstofnfrumum í skiptingu og því er þess vænst að hún geti nýst til að spá fyrir um framköllun arfgengra stökkbreytinga í þessum kímfrumum.

4. Skilgreiningar á lykilhugtökum eru settar fram í viðbætinum.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

5. Nagdýr eru venjulega notuð til þessarar prófunar en í sumum tilvikum gæti átt við að nota aðrar tegundir ef fyrir því eru vísindaleg rök. Í stöðluðum frumuerfðafræðilegum fullbúnum sýnum úr eistum nagdýra myndast miðfasar í jafnskiptingu (sáðstofnfrumur) og rýriskiptingu (sáðfrumuvísar). Miðfasar í jafnskiptingu og rýriskiptingu eru greindir á grundvelli byggingar litninganna (4. heimild). Þessi frumuerfðafræðilega prófun *í lífi* er notuð til að greina byggingarlegar litningabreytingar í jafnskiptingu sáðstofnfrumna. Þessi prófunaraðferð er ekki notuð fyrir aðrar markfrumur.

6. Til að greina litningsþráðarbreytingar í sáðstofnfrumum skal skoða frumur í fyrstu jafnskiptingunni eftir lok meðhöndlunar áður en þessum breytingum er umbreytt í litningabreytingar í næstu frumuskiptingum á eftir. Unnt er að afla frekari upplýsinga um meðhöndlaða sáðfrumuvísa með litningagreiningu, þar sem byggingarlegra litningabreytinga er leitað, í stigum frá 5. stigi fyrri prófasa til miðfasa I og II í rýriskiptingu.

7. Í eistunum er fjöldi kynslóða sáðstofnfrumna (5. heimild) og þessar mismunandi kímfrumugerðir geta verið misnæmar fyrir meðhöndlun með íðefnum. Litningabreytingarnar sem koma fram sýna því samloðunarsvörun meðhöndlaðra sáðstofnfrumuþýða. Meirihluti frumna í jafnskiptingu í fullbúnum sýnum úr eistum eru B-sáðstofnfrumur með frumuhring sem nemur u.þ.b. 26 klst. (3. heimild).

8. Þessi prófun hentar ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunaríðefnið eða umbrotsefni þess nái ekki í eistað.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

9. Alla jafna eru dýrin látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og eru síðan aflífuð þegar meðferðin hefur staðið hæfilega lengi. Dýrin eru meðhöndluð fyrir aflífun með metafasastöðvandi efni (t.d. kolsisíni eða Colcemid®). Litningasýni eru því næst útbúin úr kímfrumum og lituð og frumur í miðfasa síðan skoðaðar í leit að litningabreytingum.

SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

10. Til að staðfesta hæfi til að framkvæma greininguna skal sýna fram á getu til að endurtaka þær niðurstöður sem reiknað er með varðandi tíðni byggingarlegra litningabreytinga í sáðstofnfrumum með jákvæðum samanburðaríðefnum (þ.m.t. veikar svaranir), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1, og til að fá fram tíðni neikvæðra samanburða sem er í samræmi við viðunandi svið samanburðargagna í birtum heimildum (t.d. 2., 3., 6., 7., 8., 9. og 10. heimild) eða með rannsóknarsögulegri dreifingu samanburða hjá viðkomandi rannsóknarstofu, ef hún liggur fyrir.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Val á dýrategund

11. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Alla jafna eru notaðar karlkyns mýs en þó er heimilt að nota karldýr af öðrum heppilegum tegundum spendýra ef sett eru fram vísindaleg rök og til að gera það kleift að gera þessa prófun í tengslum við aðra prófunaraðferð. Vísindaleg rök fyrir notkun á öðrum tegundum en nagdýrum skulu sett fram í skýrslunni.

Aðbúnaður dýra og fóðrun

12. Að því er varðar nagdýr 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) ef árásargirni er ekki vænst, helst í búrum með gegnheilu gólfi með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega vera hvert í sínu búri ef fyrir því liggja vísindaleg rök.

Undirbúningur dýranna

13. Að jafnaði eru notuð heilbrigð, ung, fullvaxin karldýr (sem eru 8–12 vikna gömul í upphafi meðferðar) og eru valin af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa. 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 hvers dýrs að vera í lágmarki og ekki meiri en ± 20%.

Tilreiðsla skammta

14. 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

15. 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 gögn eða útgefin samanburðargögn sem sýna að ódæmigerði leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki byggingarlegar litningabreytingar og önnur skaðleg áhrif skal gera upphafsrannsókn til að byggja upp ásættanleika fyrir leysis-/burðarefnissamanburðinn.

Jákvæðir samanburðir

16. Ávallt skal nota dýr í samskeiða jákvæðum samanburði nema ef rannsóknarstofan hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur notað prófunina venjubundið nýlega (t.d. síðastliðin fimm ár). 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.

17. Jákvæð samanburðarefni 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. Dæmi um jákvæð samanburðarefni er að finna í töflu 1.

Tafla 1

Dæmi um jákvæð samanburðarefni

Efni [CAS-nr.] (tilvísunarnúmer)
Sýklófosfamíð (mónóhýdrat) [CAS-nr. 50-18-0 (CAS-nr. 6055-19-2)] (9. heimild)
Sýklóhexýlamín [CAS-nr. 108-91-8] (7. heimild)
Mítómýsín C [CAS-nr. 50-07-7] (6. heimild)
Einliðuakrýlamíð [CAS-nr. 79-06-1] (10. heimild)
Tríetýlenmelamín [CAS-nr. 51-18-3] (8. heimild)

Neikvæðir samanburðir

18. Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með dýr í neikvæðum samanburði sem eru meðhöndluð einvörðungu með leysi eða burðarefni og að öðru leyti meðhöndluð á sama hátt og meðferðarhóparnir. Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki litningabreytingar eða önnur skaðleg áhrif skal einnig hafa með ómeðhöndluð samanburðardýr í hvert skipti sem sýni eru tekin, til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

VERKFERLI

Fjöldi dýra

19. Hópastærðir við upphaf rannsóknarinnar skulu ákvarðaðar með það fyrir augum að með þeim fáist a.m.k. 5 karldýr á hvern hóp. Þessi fjöldi dýra á hvern hóp telst nægilegur til að veita viðeigandi tölfræðilegan styrk (þ.e. alla jafna er hægt að greina a.m.k. tvöföldun í tíðni litningabreytinga þegar neikvæð samanburðargildi eru 1,0% eða hærri og líkindin eru 80% og marktækni 0,05) (3. og 11. heimild). Til leiðbeiningar varðandi dæmigerðan hámarksfjölda dýra myndi rannsókn á tveimur sýnatökutímum með þremur skammtahópum og samskeiða neikvæðum og jákvæðum samanburðarhóp (hver þeirra samanstendur af fimm dýrum á hvern hóp), útheimta 45 dýr.

Meðferðaráætlun

20. Prófunaríðefnin eru yfirleitt gefin einu sinni (þ.e. í einni meðferð); nota má aðra skömmtunaráætlun, að því tilskildu að hún sé vísindalega rökstudd.

21. Hjá þeim hópi sem fær stærsta skammtinn eru sýni tekin tvisvar sinnum eftir meðferð. 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, eru sýni tekin einu sinni snemma og einu sinni seint, u.þ.b. 24 og 48 klukkustundum eftir lok meðferðar. Þegar um er að ræða aðra skammta en stærsta skammtinn skal taka sýni snemma innan 24 klukkustunda (áður en eða þegar frumuhringstíma B-sáðstofnfrumna lýkur til að líkur séu mestar á að geta metið fyrstu miðfasa eftir meðferð) að lokinni meðferð nema vitað sé að annar sýnatökutími henti betur og það rökstutt.

22. Taka má sýni á öðrum tímum. Ef t.d. um er að ræða íðefni sem hafa áhrif sem eru óháð S-fasa getur verið heppilegt að taka sýni fyrr (þ.e. innan 24 klukkustunda).

23. Heimilt er að nota meðferðaráætlun við endurtekna skammta s.s. í tengslum við prófun á öðrum endapunkti þar sem 28-daga inngjafartímabil er notað (t.d. prófunaraðferð B.58) en þó þyrfti fleiri dýrahópa til að taka mið af mismunandi sýnatökutímum. Til samræmis við það þarf að færa vísindaleg rök fyrir því, í hverju tilviki fyrir sig, hvort slík áætlun sé viðeigandi.

24. Áður en dýrin eru aflífuð er hæfilegum skammti af miðfasastöðvandi íðefni (t.d. Colcemid® eða kolsisíni) sprautað í kviðarhol þeirra. Eftir það eru sýni tekin úr dýrunum með hæfilegu millibili. Að því er varðar mýs og rottur er þetta millibil u.þ.b. 3–5 klukkustundir.

Skammtastærðir

25. Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir sem 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, og meðferðaráætlun og á að nota í meginrannsókninni samkvæmt ráðleggingum við framkvæmd skammtastærðarannsókna (12. heimild). Markmið þessarar rannsóknar skal vera að greina hámarksþolsskammt, skilgreindur sem skammturinn sem vekur smávægileg eiturhrif í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (t.d. óeðlilegt atferli eða viðbrögð, minni háttar þyngdartap eða frumueiturhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi) en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun dýranna nauðsynlega (13. heimild).

26. Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í sáðstofnfrumum (t.d. þau að hlutfallið milli jafnskiptinga sáðstofnfrumna og fyrsta og annars miðfasa í rýriskiptingu minnkar). Þessi minnkun má ekki fara yfir 50%.

27. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða prófunaríðefni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og ræsar) og íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.

28. Til að fá fram upplýsingar um skammtasvörun skal í heildstæðri rannsókn taka með neikvæðan samanburðarhóp (18. liður) 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 (þ.e. eistum) 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. Ef prófunaríðefnið framkallar eiturhrif skal velja háskammtinn ásamt tveimur minni skömmtum (eins og lýst er hér að framan). Háskammturinn fyrir inngjafartímabil sem er 14 dagar eða lengra er 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag og fyrir inngjafartímabil sem er styttra en 14 dagar er háskammturinn 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag.

Gjöf skammta

29. 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 eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef. Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol, nema það sé stutt vísindalegum rökum, þar eð hún er yfirleitt ekki lífeðlisfræðilega viðeigandi váhrifaleið fyrir menn. 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. 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/100g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g líkamsþyngdar. Ef meira rúmmál en það er notað (ef löggjöf um velferð dýra heimilar það) skal það rökstutt. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkleikann til að tryggja stöðugt rúmmál í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

Athuganir

30. Gera skal almennar, klíniskar 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 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 áður en prófunartímabilinu lýkur (13. heimild).

Undirbúningur litninga

31. Kímfrumusvifblöndur eru fengnar úr öðru eða báðum eistum strax eftir aflífun dýranna, settar í undirþrýsta lausn og festar samkvæmt viðurkenndri aðferðarlýsingu (t.d. 2., 14., 15. heimild). Frumunum er síðan strokið á sýnisgler og þær litaðar (16. og 17. heimild). Öll sýnisglerin skulu kóðuð til þess að auðkenni þeirra sé ekki aðgengilegt talningafólkinu.

Greining

32. Telja skal a.m.k. 200 vel dreifða miðfasa fyrir hvert dýr (3. og 11. heimild). Ef gildi rannsóknarsögulegra neikvæðra samanburða er < 1% skal telja fleiri en 200 frumur/dýr til að auka tölfræðilegan styrk. Nota skal litunaraðferðir sem gera kleift að sanngreina þráðhaft.

33. Breytingar í litningum og litningsþráðum skulu skráðar aðskilið og þær flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun). Skörð skulu skráð en ekki tekin með þegar ákvarðað er hvort íðefni framkalli marktæka aukningu á tíðni frumna með litningabreytingum. Verkferlin sem notuð eru á rannsóknarstofunni skulu tryggja að greiningar á litningabreytingum séu gerðar af vel þjálfuðu talningafólki. 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.

34. Þótt tilgangur prófunarinnar sé að greina byggingarlegar breytingar í litningum er mikilvægt að skrá tíðni fjöllitna frumna og tíðni frumna með innræna tvöföldun þegar slíkra breytinga verður vart (sjá 44. lið).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

35. Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Fyrir hvert dýr skal ákvarða fjölda frumna með byggingarlegri litningabreytingu eða byggingarlegum litningabreytingum og fjölda litningabreytinga fyrir hverja frumu. Breytingar í litningsþráðum og litningum sem eru flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun) skulu skráðar aðskilið, með fjölda þeirra og tíðni, fyrir tilrauna- og samanburðarhópa. Skörð eru skráð aðskilið. Tíðni skarða er skráð en er að jafnaði ekki tekin með í greiningunni á heildartíðni byggingarlegu litningabreytinganna. Ef fjöllitnun og frumur með innræna tvöföldun koma fram er greint frá hlutfallinu.

36. Greina skal frá gögnum um eiturhrif og klínísk einkenni (skv. 30. lið).

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

37. Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunar.

— Samskeiða neikvæður samanburður er í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, sem alla jafna er gert ráð fyrir að sé > 0% og ≤ 1,5% frumna með litningabreytingum, og rannsóknarsöguleg samanburðargögn rannsóknarstofunnar, ef þau liggja fyrir (sjá 10. og 18. lið).

— Samskeiða jákvæðir samanburðir kalla fram svaranir sem eru í samræmi við birtar viðmiðanir fyrir rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð eða rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um jákvæðan samanburð, ef hann liggur fyrir, og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við neikvæða samanburðinn (sjá 17. og 18. lið).

— Nægilegur fjöldi frumna og skammta hefur verið greindur (sjá 28. og 32. lið).

— Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 25. og 26. lið.

38. Ef bæði jafnskipting og rýriskipting sjást í sýnunum skal ákvarða hlutfallið milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar sem mælikvarða á frumueiturhrif hjá öllum meðferðardýrum og dýrum í neikvæða samanburðinum í heildarsýni með 100 frumum í skiptingu fyrir hvert dýr. Ef aðeins sést jafnskipting í sýnunum skal ákvarða jafnskiptingarhlutfallið í a.m.k. 1000 frumum fyrir hvert dýr.

Mat og túlkun á niðurstöðum

39. Greina skal a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa til að fá nægjanleg gögn til að framkvæma greiningu á skammtasvörun.

40. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

— að minnsta kosti einn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— aukningin er skammtatengd a.m.k. á einum sýnatökutíma og

— einhver niðurstaðnanna lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði, ef þau liggja fyrir (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið litningabreytingar í sáðstofnfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í heimildunum (11. og 18. heimild). Í tölfræðilegum prófunum sem eru notaðar skal líta á dýrið sem tilraunaeininguna.

41. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef:

— enginn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin skammtatengd aukning í neinum tilraunaskilyrðum, og

— allar niðurstöður lenda innan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson), ef þau liggja fyrir.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið litningabreytingar í sáðstofnfrumum tilraunadýranna. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í heimildunum (11. og 18. heimild). Neikvæð niðurstaða útilokar ekki möguleikann á að íðefnið geti vakið litningabreytingar á síðari þroskastigum, sem eru ekki rannsökuð, eða genastökkbreytingar.

42. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.

43. Ef svörunin er ekki greinilega neikvæð eða 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 með fyrirliggjandi tilraunargögnum s.s. athugun hvort jákvæð niðurstaða lendir utan ásættanlegs sviðs gagna um neikvæða samanburði eða rannsóknarsöguleg gögn rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (19. heimild).

44. 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.

45. Ef fjöllitna frumum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnið geti hamlað jafnskiptingarferlum og stuðlað að breytingum á litningafjölda (20. heimild). Ef frumum með innræna tvöföldun í litningum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnið geti stöðvað framrás frumuhringsins (21. og 22. heimild), sem er annað gangvirki sem framkallar breytingar á fjölda litninga en það sem hamlar jafnskiptingarferlum (sjá 2. lið). Því skal tíðni fjöllitna frumna og frumna með innræna tvöföldun skráð aðskilið.

Prófunarskýrsla

46. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Samantekt.

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 að framan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Tilreiðsla prófunaríðefnis:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum eða burðarefninu,

— 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 og aldur dýranna,

— 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,

— rök fyrir vali á íkomuleið,

— upplýsingar um tilreiðslu prófunaríðefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— rök fyrir vali á aflífunartímum,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum í dýrum, þ.m.t. fyrir vefjameinafræði- eða blóðgreiningar og tíðni athugana og vigtunar á dýrum, ef þær liggja fyrir,

— 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,

— aðferð við aflífun,

— aðferð við verkjastillingu (ef notuð),

— verklag við einangrun vefja,

— auðkenni miðfasastöðvandi íðefnis, styrkur þess og hversu lengi meðferð stendur,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— viðmiðanir fyrir talningu breytinga,

— fjöldi frumna sem er skoðaður úr hverju dýri,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar.

Niðurstöður:

— ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturhrif,

— líkamsþyngd og þyngd líffæra við aflífun (ef margar meðferðir eru notaðar skal mæla líkamsþyngd meðan á meðferðum stendur),

— merki um eiturhrif,

— jafnskiptingarhlutfall,

— hlutfall milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar, eða aðrar vísbendingar um váhrif á markvefinn,

— tegund og fjöldi breytinga, 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,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar,

— gögn um samskeiða, neikvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð ásamt sviðum, meðaltölum, staðalfrávikum og 95% öryggisbili (ef það liggur fyrir) eða birt rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð sem eru notuð til að meta hvort niðurstöður úr prófun séu ásættanlegar,

— gögn um samskeiða jákvæðan samanburð,

— breytingar á litnun, komi þær fram, þ.m.t. tíðni fjöllitnunar og/eða innræn tvöföldun í frumum.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstaða

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. Í: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, bls. 275–306.

3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Í: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, bls. 1–15.

6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Í: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, bls. 477–484.

7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, Í: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 115–141.

18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays Í: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 184–232.

19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

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).

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.

Fjölbreytni litninga: fjölbreytni í lögun (t.d. miðheftir, endaheftir o.s.frv.) og stærð litninga.

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að stakir litningsþræðir rofna eða þeir 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 þeir rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Efni sem veldur litningabrenglun: öll íðefni sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumuhópum eða lífverum.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur breidd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

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, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Jafnskiptingarhlutfall: hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumuhópi, vísbending um hve ör fjölgunin er í þessum frumuhópi.

Jafnskipting: skipting frumukjarnans sem skiptist oftast í forfasa, formiðfasa, miðfasa, síðfasa og lokafasa.

Stökkbreyting: 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 hjá þeim dýrum sem eru notuð.

Fjöllitnun: margfeldi á fjölda einlitna litninga (n), að tvílitnun undanskilinni (þ.e. 3*n*, 4*n* o.s.frv.).

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun á miðfasa frumuskiptingar sem úrfellingar og bútar, víxlanir.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

5) Í stað kafla B.40 í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.40 **RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ VIÐ MÆLINGAR Á RAFVIÐNÁMI GEGNUM HÚÐ (TER)**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir (2015). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]). Þessi uppfærða prófunaraðferð B.40 felur í sér prófun *í glasi* sem gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun.

2. Mat á húðætandi áhrifum hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) (2. heimild). Auk fyrirliggjandi prófunaraðferðar B.40 hafa aðrar aðferðir til prófunar *í glasi*, til prófunar á húðætingarmætti íðefna, verið fullgiltar og samþykktar sem prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir) (3. heimild) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (4. heimild), sem geta einnig sanngreint undirundirflokka ætandi íðefna ef þörf krefur. Nokkrar fullgiltar aðferðir til prófunar *í glasi* hafa verið samþykktar sem prófunaraðferð B.46 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) (5. heimild) sem nota skal til prófunar á húðertingu. Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfararstofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat á húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka ýmsar upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (6. heimild).

3. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu sem endapunkt með tilliti til heilbrigðis manna. Hún grundvallast á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (TER), þar sem notaðir eru húðflipar til að sanngreina ætandi efni eftir hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmavirkni hennar. Samsvarandi OECD-viðmiðunarregla um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2004 og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA).

4. Til að meta prófun *í glasi* á húðætingu í eftirlitsskyni voru gerðar forfullgildingarrannsóknir (7. heimild) og fylgt eftir með formlegri fullgildingarrannsókn á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð til að meta húðætingu (8.–11. heimild). Niðurstöður þessara rannsókna urðu til þess að mælt var með því að prófunaraðferðin við mælingar á rafviðnámi gegnum húð (einnig nefnd fullgilta viðmiðunaraðferðin (e. *Validated Reference Method – VRM*) yrði notuð í eftirlitsskyni við mat *í lífi* á húðætingu (12.–14. heimild).

5. Áður en hægt er að nota tillagða samsvarandi eða breytta prófunaraðferð *í glasi* við mælingar á rafviðnámi gegnum húð á húðætingu í eftirlitsskyni, aðra en fullgiltu viðmiðunaraðferðina, skal ákvarða áreiðanleika hennar, gildi (nákvæmni) og takmarkanir miðað við tillagða notkun til að tryggja að hún sé samsvarandi fullgiltu viðmiðunaraðferðinni, í samræmi við kröfurnar í nothæfisstöðlunum (15. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna, samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar prófunaraðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum.

SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í viðbætinum.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Fullgildingarrannsókn (10. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (16. og 17. heimild) hafa sýnt að með prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð er hægt að greina á milli þekktra húðætandi efna og óætandi efna með heildarnæmi sem nemur 94% (51/54) og sértæki sem nemur 71% (48/68) fyrir gagnagrunn með 122 efnum.

([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).

8. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu *í glasi*. Hún gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi prófunaríðefni í samræmi við HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Sú takmörkun er á þessari prófunaraðferð, eins og sýnt er fram á í fullgildingarrannsóknunum (8.–11. heimild), að hún gefur ekki færi á undirflokkun ætandi efna og blandna í samræmi við HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Notkun þessarar prófunaraðferðar ákvarðast af gildandi regluramma. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.46 varðar sérstaklega rannsókn *í glasi* á áhrifum húðertingar á heilbrigði (5. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (6. heimild).

9. Margvísleg íðefni, sem eru aðallega efni, hafa verið prófuð við fullgildinguna sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir 60 efni sem ná yfir margs konar íðefnaflokka (8. og 9. heimild). Á grundvelli fyrirliggjandi heildargagna hentar prófunaraðferðin fyrir margs konar íðefnaflokka og eðlisástand, þ.m.t. vökva, hálfföst efni, föst efni og vaxkennd efni. Þar eð prófunarefni með viðeigandi tilvísunargögnum eru ekki auðveldlega aðgengileg fyrir tiltekið eðlisástand skal bent á að frekar lítill fjöldi vaxkenndra efna og ætandi fastra efna voru metin í fullgildingunni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunaraðferðin sé ekki nothæf fyrir tiltekinn flokk efna skal ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk efna. Þar sem þessi prófunaraðferð hentar efnum telst hún að auki henta blöndum. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í Eskes *et. al.* 2012) (18. heimild), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. 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 enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsóknum (8. og 9. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með prófunaraðferðinni við mælingar á rafviðnámi gegnum húð er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

10. Prófunaríðefnið er látið liggja í allt að 24 klukkustundir á yfirborði húðþekju húðflipa í tveggja hólfa prófunarkerfi þar sem húðflipinn gegnir hlutverki skilrúma milli hólfanna. Húðfliparnir eru teknir af 28–30 daga gömlum rottum sem hafa verið aflífaðar á mannúðlegan hátt. Ætandi íðefni eru sanngreind eftir hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmavirkni hennar en þetta mælist sem lækkun á rafviðnámi húðar niður fyrir viðmiðunarmörk (16. heimild) (sjá 32. lið). Fyrir rafviðnám gegnum húð hjá rottum hefur þröskuldsgildið 5 k verið valið á grundvelli umfangsmikilla gagna fyrir vítt svið efna þar sem mikill meirihluti gildanna var ýmist vel yfir (oft > 10 kΩ) eða vel undir (oft < 3 kΩ) þessu gildi (16. heimild). Prófunaríðefni, sem eru óætandi í dýrum en eru ertandi eða óertandi, lækka að jafnaði ekki rafviðnámið gegnum húð niður fyrir þetta þröskuldsgildi. Enn fremur getur notkun annarra húðhluta eða annars búnaðar breytt þröskuldsgildinu og þar með gert frekari fullgildingu nauðsynlega.

11. Liður í prófunarferlinu er áfangi með leysilitarbindingu sem er staðfestingarprófun á jákvæðum niðurstöðum varðandi rafviðnám gegnum húð, þ.m.t. á gildum í kringum 5 kΩ. Áfanginn með leysilitarbindingu sýnir hvort aukning á jónalekt er vegna efnislegrar eyðileggingar á hornlagi húðarinnar. Mæling á rafviðnámi gegnum húð hefur sýnt sig að vera áreiðanleg aðferð (*í lífi*) til að segja fyrir um ætandi eiginleika hjá kanínum sem metnir eru með prófunaraðferð B.4 (2. heimild).

SÝNT FRAM Á HÆFNI

12. Áður en prófunaraðferðin við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnin tólf sem mælt er með í töflu 1. Ef efni á skránni er ekki tiltækt, eða þegar slíkt er réttlætanlegt, er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* liggja fyrir um þau (t.d. af skránni yfir viðmiðunaríðefni (16. heimild)) að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisefni ([1])

Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur ([2])	Undirflokkur HSK SÞ eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun *í lífi* ([3])	Undirflokkur fullgiltrar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun *í glasi*	Eðlisástand	pH ([4])
Ætandi efni *í lífi*						
N,N'-dímetýldípropýlentríamín	10563-29-8	lífrænn basi	1A	6 × C	Vökvi	8,3
1,2-díamínóprópan	78-90-0	lífrænn basi	1A	6 × C	Vökvi	8,3
Brennisteinssýra (10%)	7664-93-9	ólífræn sýra	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	Vökvi	1,2
Kalíumhýdroxíð (10% vatnslausn)	1310-58-3	ólífrænn basi	(1A/)1B/1C	6 × C	Vökvi	13,2
Oktan- (kapríl-)sýra	124-07-2	lífræn sýra	1B/1C	4 × C 2 × NC	Vökvi	3,6
2-tert-bútýlfenól	88-18-6	fenól	1B/1C	4 × C 2 × NC	Vökvi	3,9
Óætandi efni *í lífi*						
Ísósterínsýra	2724-58-5	lífræn sýra	NC	6 × NC	Vökvi	3,6
4-amínó-1,2,4-tríasól	584-13-4	lífrænn basi	NC	6 × NC	Fast efni	5,5
Fenetýlbrómíð	103-63-9	rafsækin	NC	6 × NC	Vökvi	3,6
4-(metýlþíó)-bensaldehýð	3446-89-7	rafsækin	NC	6 × NC	Vökvi	6,8
1,9-dekadíen	1647-16-1	hlutlaus lífræn	NC	6 × NC	Vökvi	3,9
Tetraklóretýlen	127-18-4	hlutlaus lífræn	NC	6 × NC	Vökvi	4,5

Skammstafanir: aq = vatnskenndur, CASRN = CAS-númer, VRM = fullgild viðmiðunaraðferð, C = ætandi, NC = óætandi.

([1]) Hæfnisefnin, sem voru fyrst flokkuð í annars vegar ætandi og hins vegar óætandi, síðan eftir ætandi undirundirflokki og loks íðefnaflokki, voru valin úr efnunum sem voru notuð í fullgildingarrannsókn Evrópumiðstöðvarinnar um fullgildingu staðgönguaðferða á prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (8. og 9. heimild). Nema annað sé tekið fram voru efnin prófuð á því hreinleikastigi sem þau höfðu þegar þau voru keypt á almennum markaði (8. heimild). Valið innihélt, að því marki sem hægt var, efni sem: i. eru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi; frá lítilli til mikillar ætingar) sem fullgilta viðmiðunaraðferðin getur mælt eða spáð fyrir um, ii. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem eru notaðir í fullgildingarrannsókninni, iii. endurspegla nothæfiseiginleika fullgiltu viðmiðunaraðferðarinnar, iv. hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, v. kalla fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunarprófunaraðferðinni *í lífi*, vi. eru fáanleg á markaði og vii. þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.

([2]) Íðefnaflokkur, samkvæmt Barratt *et al*. (8. heimild).

([3]) Samsvarandi pökkunarflokkar SÞ eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir undirflokka 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun.

([4]) pH-gildin eru fengin úr Fentem *et al.* (9. heimild) og Barratt *et al*. (8. heimild).

VERKFERLI

13. Staðlaðar verklagsreglur eru tiltækar fyrir prófunaraðferðina við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð að því er varðar húðætingu (19. heimild). Prófunaraðferðirnar við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, skulu uppfylla eftirfarandi skilyrði:

Dýr

14. Nota skal rottur þar eð áður hefur verið sýnt fram á næmi húðar þeirra fyrir efnum í þessari prófunaraðferð (12. heimild) og þar eð rottuhúð er eina húðin sem hefur verið formlega fullgilt (8. og 9. heimild). Aldur rottanna (þegar húðin er tekin) og stofn eru sérstaklega mikilvægir þættir til að tryggja að hársekkir þeirra séu í hvíld áður en vöxtur á fullorðinshárum hefst.

15. Hár á baki og síðum á ungum, u.þ.b. 22 daga gömlum, karl- eða kvenrottum (af Wistar-stofni eða sambærilegum stofni) er fjarlægt gætilega með litlum hárklippum. Dýrin eru síðan þvegin vandlega með rökum klút meðan klippta svæðið er baðað í sýklalyfjalausn (sem inniheldur t.d. streptómýsín, penisillín, klóramfeníkól og amfóterisín í styrkleikum sem nægja til að hindra bakteríuvöxt). Dýrin eru þvegin aftur með sýklalyfjalausn á þriðja eða fjórða degi eftir fyrsta þvottinn og eru notuð innan þriggja daga frá öðrum þvotti þegar hornlag húðarinnar hefur jafnað sig eftir að hárin voru fjarlægð.

Undirbúningur húðflipa

16. Dýrin eru aflífuð á mannúðlegan hátt þegar þau eru 28–30 daga gömul, þessi aldur er mikilvægur. Því næst er húðin flegin af baki og síðum hvers dýrs og öll umframfita fjarlægð af undirhúðinni með því að kroppa hana gætilega af húðinni. Fjarlægðir eru húðflipar, hver um sig u.þ.b. 20 mm í þvermál. Húðina má geyma áður en fliparnir eru notaðir þar sem sýnt er að jákvæð og neikvæð samanburðargögn eru jafngild þeim sem fást með nýrri húð.

17. Hver húðflipi er settur yfir annan endann á röri úr PTFE (pólýtetraflúoretýleni) þannig að öruggt sé að yfirborð húðþekjunnar sé í snertingu við rörið. Til að húðin haldist á sínum stað er O-laga gúmmíhring þrýst þétt yfir endann á rörinu og umframvefur skorinn burt. Síðan er þétt með vaselíni á milli O-gúmmíhringsins og endans á PTFE-rörinu. Rörinu er haldið uppi með fjaðurklemmu inni í viðtakahólfi sem inniheldur magnesíumsúlfatlausn (154 mM) (mynd 1). Dýfa skal húðflipanum á kaf í magnesíumsúlfatlausnina. Hægt er að ná 10–15 húðflipum úr einni rottuhúð. Mál rörsins og O-hringsins eru gefin á mynd 2.

18. Áður en prófunin hefst er rafviðnám gegnum húð mælt á tveimur húðflipum til að gæðaprófa húðina af hverju dýri. Báðir fliparnir ættu að gefa hærra rafviðnámsgildi en 10 kΩ ef hægt á að vera að nota afganginn af flipunum fyrir prófunaraðferðina. Ef viðnámsgildið er minna en 10 kΩ skal farga flipunum sem eftir eru af þeirri húð.

Notkun prófunaríðefnisins og samanburðarefna

19. Nota skal samskeiða jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir hverja keyrslu (tilraun) til að tryggja fullnægjandi frammistöðu tilraunalíkansins. Nota skal húðflipa frá einu dýri í hverri keyrslu (tilraun). Ráðlögð jákvæð og neikvæð samanburðarprófunaríðefni eru 10 M saltsýra og eimað vatn, í þeirri röð.

20. Fljótandi prófunaríðefnum (150 µl) er dreift jafnt á yfirborð húðþekjunnar inni í rörinu. Þegar efni í föstu formi eru prófuð er nægilegt magn af fasta efninu sett jafnt á flipann til að tryggja að allt yfirborð húðþekjunnar sé þakið. Afjónuðu vatni (150 µl) er síðan hellt ofan á fasta efnið og rörið hrist varlega. Til að ná hámarkssnertingu við húðina getur þurft að hita föst efni upp í 30 °C til að bræða eða mýkja prófunaríðefnið eða mala þau til að mynda korn eða duft.

21. Þrír húðflipar eru notaðir fyrir hvert prófunar- og samanburðaríðefni í hverri prófunarkeyrslu (rannsókn). Prófunaríðefnin eru látin liggja á í 24 klukkustundir við 20–23 °C. Prófunaríðefnið er fjarlægt með því að skola það af undir kranavatnsbunu við allt að stofuhita þar til búið er að fjarlægja allt efni sem hægt er.

Mælingar á rafviðnámi gegnum húð

22. Samviðnám húðar er mælt á sama hátt og rafviðnám gegnum húð með því að nota Wheatstone-brú með lágspenntum riðstraumi (18. heimild). Almennar forskriftir fyrir brúna eru 1–3 volta vinnsluspenna, 50–1000 Hz, sínuslaga eða ferhyrndur riðstraumur og a.m.k. 0,1–30 kΩ mælisvið. Brúin, sem er notuð í fullgildingarrannsókninni, mælir span, rýmd og viðnám í gildum upp í 2000 H, 2000 μF og 2 MΩ, í þessari röð, við tíðnirnar 100 Hz eða 1 kHz, með notkun raðtengdra eða hliðtengdra gilda. Að því er varðar rafviðnám gegnum húð eru mælingar á ætandi áhrifum skráðir í viðnámi, við tíðnina 100 rið og með því að nota raðgildi. Fyrir mælingu á rafviðnámi er yfirborðsspenna húðarinnar minnkuð með því að þekja húðþekjuna með nægilegu magni af 70% etanóli. Eftir nokkrar sekúndur er etanólið fjarlægt úr rörinu og vefurinn er síðan vatnaður með því að bæta við 3 ml af magnesíumsúlfatlausn (154 mM). Rafskaut brúarinnar eru sett hvort sínum megin á húðflipann til að mæla viðnámið sem kΩ/húðflipa (mynd 1). Á mynd 2 má sjá mál rafskautanna og lengd þess hluta rafskautsins sem er undir krókódílaklemmunum. Klemman á innra rafskautinu er látin hvíla á toppi PTFE-rörsins meðan á viðnámsmælingunni stendur til að tryggja að lengd þess hluta rafskautsins, sem er ofan í magnesíumsúlfatlausninni, haldist óbreytt. Ytra rafskautinu er komið fyrir inni í viðtakahólfinu þannig að það hvíli á botni hólfsins. Fjarlægðinni milli neðsta hluta fjaðurklemmunnar og botns PTFE-rörsins skal haldið stöðugri (mynd 2) þar eð þessi fjarlægð hefur áhrif á mæligildi viðnámsins. Af sömu ástæðu skal halda fjarlægðinni milli innra rafskautsins og húðflipans stöðugri og sem minnstri (1–2 mm).

23. Ef mælda viðnámsgildið er hærra en 20 kΩ getur ástæðan verið sú að leifar af prófunaríðefninu þekja yfirborðið á húðþekju húðflipans. Reyna má að fjarlægja þetta þekjandi efni, t.d. með því að halda fyrir PTFE-rörið með hanskaklæddum þumalfingri og hrista það í u.þ.b. 10 sekúndur; magnesíumsúlfatlausninni er síðan fleygt og viðnámsmælingin endurtekin með nýju magnesíumsúlfati.

24. Eiginleikar og mál prófunarbúnaðarins og tilraunaaðferðin, sem er notuð, geta haft áhrif á gildin sem fást fyrir rafviðnám gegnum húð. Viðmiðunarmörkin 5 kΩ fyrir ætandi áhrif voru ákvörðuð út frá gögnum sem aflað var með þeim tiltekna búnaði og verkferli sem er lýst í þessari prófunaraðferð. Mismunandi viðmiðunarmörk og samanburðargildi kunna að eiga við ef aðstæðum við prófun er breytt eða öðruvísi búnaður notaður. Því er nauðsynlegt að kvarða aðferðina og viðmiðunargildin fyrir viðnámið með því að gera prófanir á röð hæfnisefna, sem valin eru úr efnunum sem notuð eru í fullgildingarrannsókninni (8. og 9. heimild), eða úr íðefnaflokkum sem líkjast efnunum sem verið er að rannsaka. Nokkur viðeigandi hæfnisefni eru tilgreind í töflu 1.

Aðferðir við bindingu leysilitar

25. Váhrif frá tilteknum óætandi efnum geta orðið til þess að viðnámið lækkar niður fyrir þröskuldsgildið 5 kΩ svo að jónir geta farið í gegnum hornlag húðarinnar og lækkað þannig rafviðnámið (9. heimild). Til dæmis geta hlutlaus, lífræn efni og efni með yfirborðsvirka eiginleika (s.s. þvotta- og hreinsiefni, ýruefni og önnur yfirborðsvirk efni) fjarlægt húðlípíð og aukið jónalekt gegnum tálmann. Ef gildin fyrir rafviðnám gegnum húð, sem slík íðefni kalla fram, eru undir eða í kringum 5 kΩ og engar skemmdir er að sjá á húðflipunum skal meta hversu djúpt leysiliturinn þrengir sér í samanburðar- og meðferðarvefina til að ákvarða hvort mældu gildin fyrir rafviðnám gegnum húð voru vegna aukins gegndræpis húðarinnar eða vegna húðætingar (7. og 9. heimild). Í síðarnefnda tilvikinu, þar sem hornlag húðarinnar er rofið, smýgur leysiliturinn súlforhódamín-B hratt í gegnum húðyfirborðið, þegar hann er borinn á það, og litar undirliggjandi vef. Þessi tiltekni leysilitur er stöðugur gagnvart margs konar efnum og útdráttaraðferðin, sem lýst er hér á eftir, hefur ekki áhrif á hann.

Leysiliturinn súlforhódamín B settur á og fjarlægður

26. Að loknu mati á rafviðnámi gegnum húð er magnesíumsúlfatinu úr túpunni hent og húðin skoðuð vandlega með tilliti til greinilegra skemmda. Ef engar greinilegar skemmdir eru (t.d. götun) eru 150 μl af 10% (þyngd miðað við rúmmál) lausn leysilitarins súlforhódamíns-B (Acid Red 52, C.I. 45100, CAS-nr. 3520-42-1) í eimuðu vatni látnir liggja á yfirborði húðþekju hvers húðflipa í tvær klukkustundir. Þessir húðflipar eru síðan skolaðir undir kranavatnsbunu við allt að stofuhita í u.þ.b. 10 sekúndur til að fjarlægja umframmagn leysilitar eða óbundinn leysilit. Hver húðflipi er tekinn gætilega af PTFE-rörinu og settur í hettuglas (t.d. 20 ml glas til sindurmælinga) sem inniheldur afjónað vatn (8 ml). Hettuglösin eru hrist varlega í 5 mínútur til að fjarlægja allar leifar af óbundnum leysilit.

Þetta skolunarferli er síðan endurtekið og húðfliparnir því næst fjarlægðir og settir í hettuglös með 5 ml af 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfati í eimuðu vatni, og hafðir í hitaskáp yfir nótt við 60 °C.

27. Eftir þetta er hver húðflipi fjarlægður og honum fleygt og lausnin, sem eftir er, skilin í skilvindu í 8 mínútur við 21 °C (hlutfallslegur miðflóttakraftur ~ 175 × g). Þá er 1 ml sýnis af flotinu þynntur í rúmmálshlutfallinu 1 á móti 5 (þ.e. 1 ml + 4 ml) með 30% (massi miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfats í eimuðu vatni. Ljósþéttni lausnarinnar er mæld við 565 nm.

Útreikningur á leysilitarinnihaldi

28. Innihald leysilitarins súlforhódamíns-B í hverjum flipa er reiknað út frá ljósþéttnigildunum (9. heimild) (móleðlisgleypnistuðullinn fyrir leysilitinn súlforhódamín-B við 565 nm = 8,7 × $l0^4$, sameindaþyngd = 580). Leysilitarinnihaldið er ákvarðað fyrir hvern húðflipa með því að nota viðeigandi kvörðunarferil og meðalleysilitar-innihaldið er síðan reiknað út fyrir alla húðflipana.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

29. Meðalgildi niðurstaðna úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð er tekið gilt ef samskeiða, jákvæðu og neikvæðu samanburðargildin falla innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina sem er notuð á prófunarstofunni. Viðurkennd viðnámssvið fyrir aðferðina og búnaðinn, sem lýst er hér að framan, eru gefin í eftirfarandi töflu:

Samanburður	Efni	Viðnámssvið (kΩ)
Jákvæður	10 M saltsýra	0,5–1,0
Neikvæður	Eimað vatn	10–25

30. Meðaltal niðurstaðna fyrir bindingu leysilitar er tekið gilt með því skilyrði að gildi úr samskeiða samanburðinum séu innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina. Tillögur að ásættanlegum dreifisviðum leysilitarinnihalds fyrir samanburðarefnin, aðferðina og búnaðinn, sem er lýst hér að framan, eru settar fram í eftirfarandi töflu:

Samanburður	Efni	Dreifisvið leysilitarinnihalds (µg/flipa)
Jákvæður	10 M saltsýra	40–100
Neikvæður	Eimað vatn	15–35

Túlkun niðurstaðna

31. Þröskuldsgildi fyrir rafviðnám gegnum húð, sem greinir ætandi frá óætandi prófunaríðefnum, var ákvarðað við bestun prófunaraðferðarinnar, prófað á forfullgildingarstigi og staðfest með formlegri fullgildingarrannsókn.

32. Spálíkan fyrir prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum rottuhúð (9. og 19. heimild), sem tengist flokkunarkerfi HSK/SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun, er sett fram hér fyrir neðan:

Prófunaríðefnið telst ekki vera húðætandi:

i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er hærra en (>) 5 kΩ eða

ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og (≤) 5 kΩ og

— húðfliparnir eru ekki með neinar greinilegar skemmdir (t.d. götun) og

— ef meðalleysilitarinnihald flipans er minna en (<) meðalleysilitarinnihald flipans í samskeiða jákvæða samanburðinum með 10 M HCl (sjá 30. lið fyrir gildi jákvæðar samanburðarins).

Prófunaríðefnið telst vera húðætandi:

i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og (≤) 5 kΩ og húðfliparnir eru greinilega skaddaðir (t.d. gataðir) eða

ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunaríðefnið, er minna en eða jafnt og (≤) 5 kΩ og

— húðfliparnir eru ekki með neinar greinilegar skemmdir (t.d. götun) en

— meðalleysilitarinnihald flipans er meira en eða jafnt og (≥) meðalleysilitarinnihald flipans í samskeiða jákvæða samanburðinum með 10 M HCl (sjá 30. lið fyrir gildi jákvæða samanburðarins).

33. Prófunarkeyrsla (tilraun) á a.m.k. þremur samhliða húðflipum ætti að nægja ef flokkun prófunarefnisins er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhliða mælingum og/eða meðalgildi rafviðnáms gegnum húð er jafnt og 5 ± 0,5 kΩ, skal tekið til athugunar að gera aðra óháða prófunarkeyrslu (tilraun), sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum (tilraununum) tveimur.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

34. Viðnámsgildi (kΩ) og gildi fyrir leysilitarinnihald (µg/flipa), eftir því sem við á, skulu sett fram í töfluformi fyrir prófunaríðefnið og jákvæð og neikvæð samanburðarefni, þ.m.t. gögn fyrir hvern einstakan samhliða húðflipa í hverri prófunarkeyrslu (tilraun) og meðalgildi ± staðalfrávik. Greina skal frá öllum endurteknum tilraunum. Greina skal frá skemmdum á húðflipum fyrir hvert prófunaríðefni.

Prófunarskýrsla

35. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni og samanburðarefni:

— efni með einum efnisþætti: 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 blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli,

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,

— meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,

— geymsluskilyrði.

Tilraunadýr:

— stofn og kyn,

— aldur dýranna þegar þau eru notuð sem gjafadýr,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— lýsing á undirbúningi húðhlutans.

Prófunarskilyrði:

— kvörðunarferlar fyrir prófunarbúnað,

— kvörðunarferlar fyrir framkvæmd prófunar á bindingu leysilitar, bandsía til mælingar á ljósþéttnigildum og línuleikasvið mælibúnaðar fyrir ljósþéttni (t.d. litrófsmælir), ef við á,

— upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mælingar á rafviðnámi gegnum húð,

— upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mat á leysilitarbindingunni, ef við á,

— prófunarskammtar, lengd váhrifatímabils eða váhrifatímabila og hitastig við váhrif,

— upplýsingar um verkferli við þvott eftir váhrifatímabilið,

— fjöldi samhliða húðflipa fyrir hvert prófunaríðefni og hvern samanburð (jákvæður og neikvæður samanburður),

— lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

— tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:

i. ásættanleiki gilda fyrir rafviðnám í gegnum húð (í kΩ) fyrir jákvæða og neikvæða samanburðinn, með tilvísun í viðnámssvið jákvæða og neikvæða samanburðarins

ii. ásættanleiki gilda fyrir leysilitarinnihald jákvæða og neikvæða samanburðarins (í µg/húðflipi), með tilvísun í gildissvið leysilitarinnihalds jákvæða og neikvæða samanburðarins

iii. ásættanleiki niðurstaðna úr prófun með tilvísun í rannsóknarsögulegan breytileika milli samhliða húðflipa

— lýsing á viðmiðunum fyrir ákvarðanir/spálíkani.

Niðurstöður:

— gögn úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð og leysilitarbindingu (ef við á) skulu sett fram í töfluformi fyrir hvert prófunaríðefni og hvern samanburð, fyrir hverja prófunarkeyrslu (tilraun) og hvern samhliða húðflipa (hvert dýr og hvert húðsýni), meðaltal, staðalfrávik og frávikssstuðul,

— lýsing á öllum áhrifum sem vart verður,

— afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Ályktanir

HEIMILDIR

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

2) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/húðæting.

3) Kafli B.40a í þessum viðauka, Líkan af mannshúð *í glasi*.

4) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð *í glasi* með tálma úr himnu.

5) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðertingu: prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns.

6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter 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. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

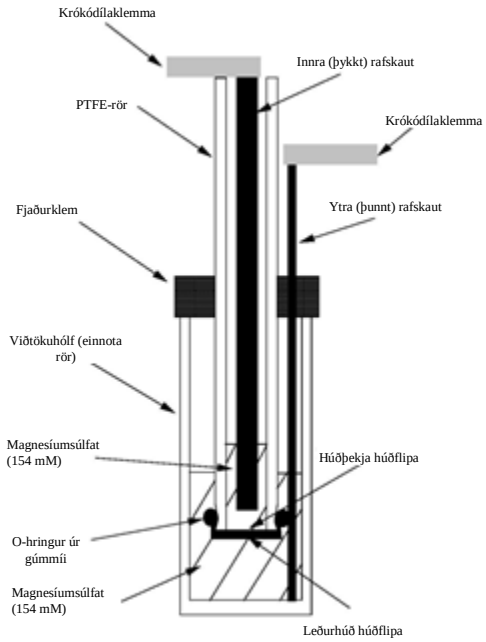
18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

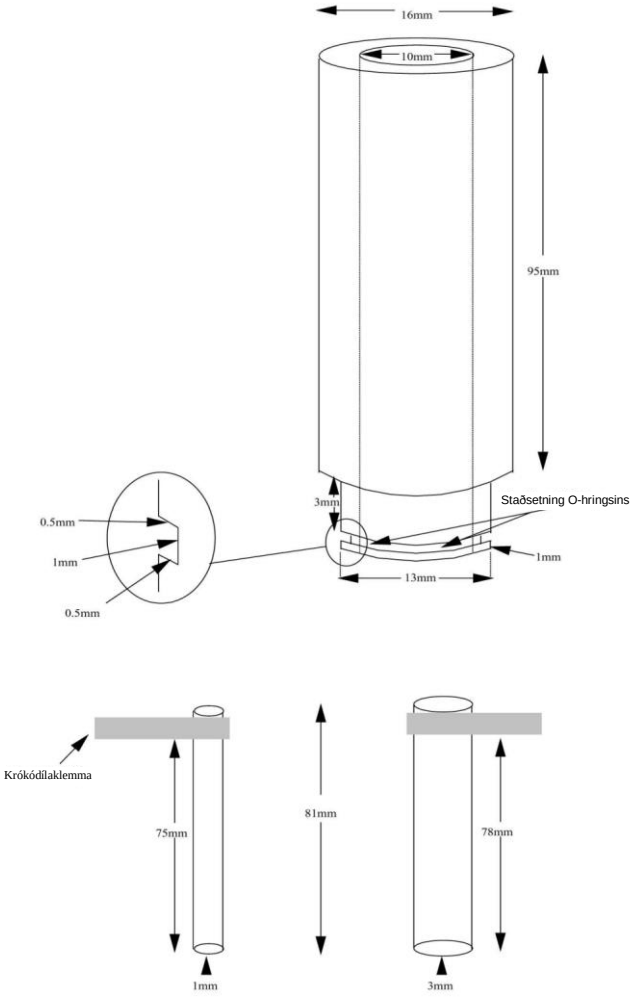
Mynd 1

Búnaður fyrir mælingu á rafviðnámi gegnum rottuhúð



Mynd 2

Stærðarmál pólýtetraflúoretýlen-rörsins og viðtökuröranna og rafskautanna sem eru notuð



Mikilvægir þættir búnaðarins sem sýndur er hér að framan:

— innra þvermál PTFE-rörsins,

— lengd rafskautanna í hlutfalli við PTFE-rörið og viðtökurörið: rafskautin eiga ekki að snerta húðflipann og rafskaut af staðallengd á að vera í snertingu við magnesíumsúlfatlausnina,

— magnið af magnesíumsúlfatlausn í viðtökurörinu: dýpt vökvans, í hlutfalli við hæðina í PTFE-rörinu, á að vera eins og sýnt er á mynd 1,

— húðflipann þarf að festa nægilega vel á PTFE-rörið til að rafviðnámið sé raunsönn mæling á eiginleikum húðarinnar.

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 (20. heimild).

C: Ætandi.

Íðefni: Efni eða blanda.

Samsvörun: Mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (20. heimild).

HSK (hnattsamræmt kerfi til flokkunar og merkingar á íðefnum (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).

IATA: Samþættar aðferðir við prófun og mat.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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.

NC: Óætandi.

OD: Ljósþéttni.

PC: 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.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (9. heimild).

Gildi: Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (20. 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 samanburðar-nákvæmni (20. 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 (20. heimild).

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

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 (20. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

(Prófunar)keyrsla: Stakt prófunaríðefni í samskeiða prófun á a.m.k. þremur samhliða húðflipum.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Rafviðnám gegnum húð (TER): Mælikvarði á samviðnám húðarinnar, sett fram í kílóómum. Þetta er einföld og traust aðferð til að meta tálmavirknina með því að skrá ferð jóna gegnum húðina með Wheatstone-brú.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

6) Í stað kafla B.40a í B-hluta kemur eftirfarandi:

„B.40a **RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS (RhE)**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir (2016). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]). Þessi uppfærða prófunaraðferð B.40a felur í sér prófun *í glasi* sem gerir kleift að greina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Hún gefur einnig færi á undirflokkun ætandi efna að hluta til.

2. Mat á ætingarmætti íðefna hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015) (2. heimild). Auk fyrirliggjandi prófunaraðferðar B.40a hafa tvær aðrar prófunaraðferðir *í glasi* til prófunar á ætingarmætti íðefna verið fullgiltar og samþykktar sem prófunaraðferð B.40 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir) (3. heimild) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (4. heimild). Enn fremur hefur prófunaraðferð B.46 *í glasi* (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) (5. heimild) verið samþykkt fyrir prófun á húðertingarmætti. Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfararstofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat varðandi húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (6. heimild).

3. Þessi prófunaraðferð varðar húðætingu sem endapunkt með tilliti til heilbrigðis manna. Í henni er notuð endurgerð húðþekja manns (sem er fengin úr óummynduðum hyrnisfrumum manns) sem líkir nákvæmlega eftir vefjafræðilegum, formfræðilegum, lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum efri hluta mannshúðar, þ.e. húðþekjunnar. Samsvarandi OECD-viðmiðunarregla um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2004 og uppfærð árið 2013 til að hún næði yfir fleiri prófunaraðferðir þar sem líkön með endurgerðri húðþekju manns eru notuð og þann möguleika að nota aðferðirnar til að styðja undirflokkun ætandi íðefna, og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og innleiða notkun annarrar aðferðar til að mæla lífvænleika.

4. Þessi prófunaraðferð nær yfir fjögur fullgilt líkön með endurgerðri húðþekju manns sem eru fáanleg á almennum markaði. Forfullgildingarrannsóknir (7. heimild), sem fylgt er eftir með formlegri fullgildingarrannsókn til að meta húðætingu (8.–10. heimild), hafa verið framkvæmdar fyrir tvö þessara prófunarlíkana sem eru fáanleg á almennum markaði, EpiSkin™ Standard Model (SM) og EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (sem í eftirfarandi texta eru kallaðar fullgiltar viðmiðunaraðferðir). Niðurstöður úr þeim rannsóknum urðu til þess að mælt var með því að fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar tvær, sem getið er hér að ofan, yrðu notaðar í eftirlitsskyni til að greina ætandi efni (C) frá óætandi efnum (NC) og að EpiSkin™ yrði auk þess notuð til að styðja undirflokkun ætandi efna (13.–15. heimild). Tvö önnur prófunarlíkön til rannsóknar á húðætingu *í glasi* með endurgerðri húðþekju manns, sem eru fáanleg á almennum markaði, hafa sýnt svipaðar niðurstöður og fullgilta viðmiðunaraðferðin EpiDerm™ samkvæmt fullgildingu byggðri á nothæfisstöðlum (16.–18. heimild). Um er að ræða SkinEthic™ RHE ([2]) og epiCS® (áður nefnt EST-1000) sem einnig er unnt að nota í eftirlitsskyni til að greina ætandi efni frá óætandi efnum (19. og 20. heimild). Rannsóknir eftir fullgildingu, sem framleiðendur líkansins með endurgerðri húðþekju manns (RhE) framkvæmdu á árunum 2012–2014 með endurbættri aðferðarlýsingu sem leiðrétti truflanir af völdum ósértækrar afoxunar MTT vegna prófunaríðefnanna, bættu hæfni til að greina á milli ætandi og óætandi efna og til að styðja undirflokkun ætandi efna (21. og 22. heimild). Frekari tölfræðilegar greiningar á gögnum eftir fullgildingu, sem er aflað með EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og EpiCS®, hafa verið gerðar til að greina önnur spálíkön sem bættu spágetu að því er varðar undirflokkun (23. 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).

([2]) Skammstöfunin RhE (= endurgerð húðþekja manns) er notuð fyrir öll líkön sem byggja á RhE-tækni. Skammstöfunin RHE sem er notuð í tengslum við SkinEthic™ líkanið táknar það sama en er skrifað með hástöfum þar eð hún er hluti heitis þessarar tilteknu prófunaraðferðar eins og hún er sett á markað.

5. Áður en hægt er að nota tillagða samsvarandi eða breytta prófunaraðferð *í glasi* með endurgerðri húðþekju manns í eftirlitsskyni, aðrar en fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar, skal ákvarða áreiðanleika hennar, gildi (nákvæmni) og takmarkanir miðað við tillagða notkun til að tryggja að hún sé samsvarandi fullgiltu viðmiðunaraðferðunum, í samræmi við kröfurnar í nothæfisstöðlunum (24. heimild), sem settar eru fram í samræmi við meginreglur leiðbeiningarskjals Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (25. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í samsvarandi viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar prófunaraðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum. Prófunarlíkönin, sem sú viðmiðunarregla um prófanir nær yfir, er unnt að nota til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunaraðferðum *í glasi* á húðætingu og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna.

SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Þessi prófunaraðferð gerir kleift að sanngreina óætandi og ætandi efni og blöndur í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun. Þessi prófunaraðferð styður enn frekar undirflokkun ætandi efna og blandna í valkvæðan undirundirflokk 1A í samræmi við HSK SÞ (1. heimild) sem og samsetningu undirflokkanna 1B og 1C (21.–23. heimild). Þessi prófunaraðferð er takmörkuð að því leyti að hún gerir ekki kleift að greina á milli húðætandi efna í undirundirflokki 1B og undirundirflokki 1C í samræmi við HSK SÞ og reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun, vegna takmarkaðs fjölda vel þekktra ætandi íðefna í undirflokki 1C sem eru húðætandi *í lífi*. Með prófunarlíkönunum EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS® er hægt að undirflokka (þ.e. greina á milli 1A og 1B/1C og óætandi efna (NC)).

8. Margvísleg íðefni, sem eru aðallega stök efni, hafa verið prófuð við fullgildinguna til stuðnings prófunarlíkönunum sem þessi prófunaraðferð nær yfir þegar þau eru notuð til greiningar á óætandi og ætandi efnum; gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir 60 íðefni sem ná yfir margs konar íðefnaflokka (8.–10. heimild). Hönnuðir prófunaraðferðarinnar gerðu prófun til að sýna fram á næmi, sértæki, nákvæmni og samanburðarnákvæmni greiningarinnar innan rannsóknarstofu að því er varðar undirflokkun og Efnahags- og framfarastofnunin fór yfir niðurstöðurnar. Á grundvelli fyrirliggjandi heildargagna er prófunaraðferðin nothæf fyrir vítt svið efnaflokka í ýmsu eðlisástandi, þ.m.t. vökva, hálfföst efni, föst efni og vaxkennd efni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir séu ekki nothæf fyrir tiltekinn flokk prófunaríðefna skal ekki nota þau fyrir þann tiltekna flokk prófunaríðefna. Þar sem þessi prófunaraðferð hentar efnum telst hún að auki henta blöndum. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í 18. heimild), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. 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 enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsóknum (8.–10. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með tækninni sem notar endurgerða húðþekju manns er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.

9. Prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan og prófunaríðefni sem geta afoxað líflitinn MTT beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika vefs og þörf er á aðlöguðum samanburði til leiðréttingar. Gerð aðlagaðs samanburðar sem kann að vera þörf á fer eftir því hvers konar truflun prófunaríðefnið veldur og eftir aðferðinni sem er notuð til að mæla MTT-formasan (sjá 25.–31. lið).

10. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki nægilegar upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að með prófunaraðferð B.46 eru einkum áhrif húðertingar á heilbrigði rannsökuð *í glasi* og hún byggist á sama prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns, þótt notuð sé önnur aðferðarlýsing (5. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (6. heimild). Þessi nálgun með samþættum aðferðum við prófun og mat nær yfir prófanir *í glasi* á húðætingu (eins og lýst er í þessari prófunaraðferð) og húðertingu áður en metið er hvort gera skuli prófanir á lifandi dýrum. Viðurkennt er að notkun mannshúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Prófunaríðefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan með endurgerðri húðþekju manns sem samanstendur af óumbreyttum hyrnisfrumum manns sem hafa verið ræktaðar til að mynda marglaga, mjög aðgreint líkan af húðþekju manns. Líkanið samanstendur af grunn-, þyrni- og kornalagi og marglaga hornlagi sem í eru, milli frumna, fitulagaþynnur sem eru dæmigerðar fyrir helstu flokka lípíða, hliðstæðum þeim sem finnast *í lífi*.

12. Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns byggist á þeirri forsendu að ætandi íðefni geti gengið inn í hornlag húðþekjunnar með flæði eða rofi og séu frumudrepandi fyrir frumur í undirliggjandi lögum. Lífvænleiki frumna er mældur með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár-tetrasólíumbrómíð, CAS-nr. 298-93-1] í blátt formasansalt sem er mælt megindlega eftir útdrátt úr vefjum (27. heimild). Ætandi íðefni eru greind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna niður fyrir skilgreind viðmiðunargildi (sjá 35. og 36. lið). Aðferð til prófunar á húðætingu með endurgerðri húðþekju manns hefur sýnt sig að vera áreiðanleg aðferð *í lífi* til að spá fyrir um húðætandi áhrif hjá kanínum sem metin eru samkvæmt prófunaraðferð B.4 (2. heimild).

SÝNT FRAM Á HÆFNI

13. Áður en fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem fylgja þessari prófunaraðferð, eru tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnin tólf sem tilgreind eru í töflu 1. Ef aðferð er notuð til undirflokkunar skal einnig sýna fram á rétta undirundirflokkun. Ef efni á skránni er ekki tiltækt, eða þegar slíkt er réttlætanlegt, er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* liggja fyrir um þau (t.d. af skránni yfir viðmiðunaríðefni (24. heimild)) að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisefni ([1])

Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur ([2])	Undirflokkur HSK/SÞ eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun *í lífi* ([3])	Undirflokkur fullgiltrar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun *í glasi* ([4])	MTT-afoxari ([5])	Eðlisástand
Undirundirflokkur 1A ætandi efni *í lífi*						
Brómóediksýra	79-08-3	Lífræn sýra	1A	(3) 1A	—	S
Bórtríflúoríðdíhýdrat	13319-75-0	Ólífræn sýra	1A	(3) 1A	—	L
Fenól	108-95-2	Fenól	1A	(3) 1A	—	S
Díklóróasetýlklóríð	79-36-7	Rafsækin	1A	(3) 1A	—	L
Samsetning ætandi efna *í lífi* í undirundirflokkum 1B og 1C						
Glýoxýlsýrumónóhýdrat	563-96-2	Lífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	S

Efni	CAS-númer	Íðefnaflokkur ([2])	Undirflokkur HSK/SÞ eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 byggt á niðurstöðum úr prófun *í lífi* ([3])	Undirflokkur fullgiltrar viðmiðunaraðferðar byggt á niðurstöðum úr prófun *í glasi* ([4])	MTT-afoxari ([5])	Eðlisástand
Undirundirflokkur 1A ætandi efni *í lífi*						
Mjólkursýra	598-82-3	Lífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	L
Etanólamín	141-43-5	Lífrænn basi	1B	(3) 1B og 1C	Y	Seigfljótandi
Saltsýra (14,4%)	7647-01-0	Ólífræn sýra	1B og 1C	(3) 1B og 1C	—	L
Óætandi efni *í lífi*						
Fenetýlbrómíð	103-63-9	Rafsækin	NC	(3) NC	Y	L
4-amínó-1,2,4-tríasól	584-13-4	Lífrænn basi	NC	(3) NC	—	S
4-(metýlþíó)-bensaldehýð	3446-89-7	Rafsækin	NC	(3) NC	Y	L
Lárínsýra	143-07-7	Lífræn sýra	NC	(3) NC	—	S

Skammstafanir: CASRN = CAS-númer, VRM = fullgilt viðmiðunaraðferð, NC = óætandi, Y = já, S = fast efni, L = vökvi

([1]) Hæfnisefnin, sem voru fyrst flokkuð í annars vegar ætandi og hins vegar óætandi, síðan eftir ætandi undirundirflokki og loks eftir íðefnaflokki, voru valin úr efnunum sem eru notuð í fullgildingarrannsóknum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða á EpiSkin™ og EpiDerm™ (8.–10. heimild) og úr rannsóknum eftir fullgildingu sem byggjast á gögnum frá hönnuðum EpiSkin™ (22. heimild), EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® (23. heimild). Nema annað sé tekið fram voru efnin prófuð á því hreinleikastigi sem þau höfðu þegar þau voru keypt á almennum markaði (8. og 10. heimild). Valið innihélt, að því marki sem hægt var, efni sem: i. eru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi, frá lítilli til mikillar ætingar) sem fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar geta mælt eða spáð fyrir um, ii. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem eru notaðir í fullgildingarrannsóknunum, iii. hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, iv. kalla fram samanburðarnákvæmar niðurstöður í fullgiltu viðmiðunaraðferðinni, v. kalla fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunarprófunaraðferðinni *í lífi*, vi. eru fáanleg á markaði og vii. þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.

([2]) Íðefnaflokkur, samkvæmt Barratt *et al*. (8. heimild).

([3]) Samsvarandi pökkunarflokkar SÞ eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun.

([4]) Spárnar úr fullgiltu viðmiðunaraðferðunum *í glasi*, sem greint er frá í þessari töflu, eru fengnar með EpiSkin™ og EpiDerm™ prófunarlíkönum (fullgiltar viðmiðunaraðferðir) í prófunum sem hönnuðir prófunaraðferðarinnar framkvæmdu eftir fullgildingu.

([5]) Gildi fyrir lífvænleika sem fengust í fullgildingarrannsóknum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða á húðætingu voru ekki leiðrétt að því er varðar beina afoxun MTT (í fullgildingarrannsóknunum voru ekki gerðir samanburðir með dauðum vef). Gögnin eftir fullgildingu, sem hönnuðir prófunaraðferðarinnar öfluðu og eru sett fram í þessari töflu, fengust þó með aðlöguðum samanburðum (23. heimild).

14. Mælt er með því að notandinn sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra, samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda líkansins með endurgerðri húðþekju manns, til að sýna fram á hæfni. Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófunaraðferð hefur verið notuð á árangursríkan hátt og sýnt hefur verið fram á hæfni í notkun hennar þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófunaraðferð er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

VERKFERLI

15. Eftirfarandi er almenn lýsing á þáttum og tilhögun prófunarlíkananna með endurgerðri húðþekju manns til að meta húðætingu sem þessi prófunaraðferð nær yfir. Líkönin með endurgerðri húðþekju manns sem viðurkennd eru sem vísindalega gild til notkunar innan þessarar prófunaraðferðar, þ.e. líkönin EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE og epiCS® (16., 17., 19. og 28.–33 heimild), fást á almennum markaði. Staðlaðar verklagsreglur fyrir þessi fjögur líkön með endurgerði húðþekju manns eru tiltækar (34.–37. heimild) og helstu þættir prófunaraðferðarinnar eru teknir saman í 2. viðbæti. Mælt er með því að fletta upp í viðkomandi stöðluðum verklagsreglum þegar eitt af líkönunum er innleitt og notað á rannsóknarstofu. Prófun með prófunarlíkönunum fjórum með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, skal uppfylla eftirfarandi:

ÞÆTTIR Í PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS

Almennar aðstæður

16. Nota skal óumbreyttar hyrnisfrumur manns til að endurgera þekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum (grunnlag, þyrnilag, kornalag) undir virku hornlagi. Hornlagið skal vera marglaga með grundvallarfitusniði til að veita virkan, traustan tálma gegn því að frumudrepandi viðmiðunaríðefni, t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það. Sýna skal fram á tálmavirknina og hana má meta, annaðhvort með því að ákvarða við hvaða styrk viðmiðunaríðefni dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC_{50}) eftir fastan váhrifatíma eða með því að ákvarða hve langan váhrifatíma þarf til að draga úr lífvænleika frumna um 50% (ET_{50}) þegar viðmiðunaríðefnið er sett á í tilteknum, föstum styrk (sjá 18. lið). Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lífvænlegum vef en það myndi skerða getu líkansins með endurgerðri húðþekju manns til að lýsa váhrifum á húð. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal vera laust við smit af völdum baktería, veira, berfryminga eða sveppa.

Virkniaðstæður

Lífvænleiki

17. Greiningin sem er notuð til að magngreina lífvænleika vefja er greining með MTT-lit (27. heimild). Lífvænlegar frumur í vefjalíkani með endurgerðri húðþekju manns afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópanóli (eða svipuðum leysi). Ljósþéttni hreins útdráttarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. < 0,1. Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan með annað hvort staðalgleypni (ljósþéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (38. heimild). Notendur líkans með endurgerðri húðþekju manns skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota notaðs líkans með endurgerðri húðþekju manns uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljósþéttnigildi neikvæða samanburðarins. Ásættanlegt svið fyrir ljósþéttnigildi neikvæða samanburðarins fyrir fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er tilgreint í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun skal nota ljósþéttnisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Skjalfest skal að vefirnir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðum samanburði, séu stöðugir í ræktun (gefi svipaðar ljósþéttnimælingar) meðan váhrifatímabil stendur yfir.

Tafla 2

Ásættanlegt svið ljósþéttnigilda neikvæðs samanburðar fyrir gæðaeftirlit með framleiðslulotum

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Tálmavirkni

18. Hornlagið og samsetning lípíðanna í því ætti að nægja til að koma í veg fyrir að tiltekin frumudrepandi viðmiðunaríðefni (t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100) gangi hratt inn í það, miðað við IC_{50} eða ET_{50} (tafla 3). Hönnuður eða seljandi líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal sýna fram á tálmavirkni hverrar framleiðslulotu líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 21. lið).

Formfræði

19. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á líkaninu með endurgerðri húðþekju manns til að sýna fram á að bygging hennar sé marglaga og lík húðþekju manns sem inniheldur grunnlag, þyrnilag, kornalag og hornlag húðar og sýnir fitusnið sem svipar til fitusniðs í húðþekju manns. Hönnuður eða seljandi líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal veita upplýsingar um vefjafræðilega rannsókn á hverri framleiðslulotu líkansins með endurgerðri húðþekju manns þar sem sýnt er fram á viðeigandi formfræði vefjanna þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 21. lið).

Samanburðarnákvæmni

20. Notendur prófunaraðferðarinnar skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni prófunaraðferðanna til lengri tíma með jákvæðum og neikvæðum samanburðum. Enn fremur skal eingöngu nota prófunaraðferðina ef hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns leggur fram gögn sem sýna fram á samanburðarnákvæmni til lengri tíma með ætandi og óætandi íðefnum úr t.d. skránni yfir hæfnisefni (tafla 1). Ef um er að ræða notkun prófunaraðferðar til undirflokkunar skal einnig sýna fram á samanburðarnákvæmni að því er varðar undirflokkun.

Gæðaeftirlit

21. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal eingöngu notað ef hönnuður eða birgir sýnir fram á að hver framleiðslulota líkana með endurgerðri húðþekju manns, sem er notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta *lífvænleiki* (17. liður), *tálmavirkni* (18. liður) og *formfræði* (19. liður) mestu máli. Notendur prófunaraðferðarinnar fá gögn um þau atriði afhent svo þeir geti haft þær upplýsingar með í prófunarskýrslunni. Aðeins er hægt að samþykkja niðurstöður, sem fást með vefjalotum sem eru viðurkenndar samkvæmt gæðaeftirliti, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um ætingarflokkun. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns staðfestir ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir IC50 eða ET50. Ásættanlegt svið fyrir fullgiltu aðferðirnar fjórar er gefið í töflu 3.

Tafla 3

Gæðaeftirlitsviðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslulota

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM) (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (33. heimild)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100) (34. heimild)	ET50 = 4,0 klst.	ET50 = 8,7 klst.
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (35. heimild)	ET50 = 4,0 klst.	ET50 = 10,0 klst.
epiCS® (1% Triton X-100) (36. heimild)	ET50 = 2,0 klst.	ET50 = 7,0 klst.

Prófunar- og samanburðaríðefni sett á

22. Nota skal a.m.k. tvö samhliða vefjasýni fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðinn fyrir hvert váhrifatímabil. Nota skal nægilegt magn prófunaríðefnisins, bæði þegar um er að ræða fljótandi og föst íðefni, til að þekja yfirborð húðþekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt, þ.e. nota skal minnst 70 µl/cm^2 eða 30 mg/cm^2. Með hliðsjón af því um hvaða líkan er að ræða skal væta yfirborð húðþekjunnar með afjónuðu eða eimuðu vatni áður

en föst íðefni eru sett á til að tryggja góða snertingu prófunaríðefnisins við yfirborð húðþekjunnar (34.–37. heimild). Prófa skal föst efni í fíngerðu duftformi þegar því verður við komið. Notkunaraðferðin skal hæfa prófunaríðefninu (sjá t.d. 34–37. heimild). Í lok váhrifatímabils skal skola prófunaríðefnið vandlega af húðþekjunni með vatnskenndri jafnalausn eða 0,9% NaCl. Með hliðsjón af því hvert af fullgiltu prófunarlíkönunum fjórum með endurgerðri húðþekju manns er notað eru tvö eða þrjú váhrifatímabil notuð fyrir hvert prófunaríðefni (fyrir öll fjögur fullgiltu líkönin með endurgerðri húðþekju manns: 3 mín. og 1 klst.; fyrir EpiSkin™ viðbótarváhrifatími sem nemur 4 klst.). Með hliðsjón af prófunarlíkaninu með endurgerðri húðþekju manns sem er notað og váhrifatímabili sem er metið getur ræktunarhiti meðan á váhrifum stendur verið á milli stofuhita og 37 °C.

23. Nota skal samskeiða neikvæðan og jákvæðan samanburð í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (með neikvæða samanburðinum), tálmavirkni og næmi vefjanna, sem af henni leiðir (með jákvæða samanburðinum), séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Tillögð íðefni fyrir jákvæðan samanburð eru ísedik eða 8N KOH með hliðsjón af því líkani með endurgerðri húðþekju manns sem er notað. Það skal tekið fram að 8N KOH er beinn MTT-afoxari og þörf gæti verið á aðlöguðum samanburðum eins og lýst er í 25. og 26. lið. Mælt er með 0,9% (massi miðað við rúmmál) NaCl eða vatni fyrir neikvæða samanburði.

Mælingar á lífvænleika frumna

24. Greiningu með MTT, sem er megindleg aðferð, skal nota til að mæla lífvænleika frumna í þessari prófunaraðferð (27. heimild). Vefjasýnið er sett í MTT-lausn í hæfilegum styrk (0,3 eða 1 mg/ml) í 3 klukkustundir. Útfellt, blátt formasan er svo dregið út úr vefnum með leysi (t.d. ísóprópanóli, súru ísóprópanóli) og formasanstyrkurinn er mældur með því að ákvarða ljósþéttni við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki ± 30 nm eða með litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun (sjá 30. og 31. lið) (38. heimild).

25. Prófunaríðefni geta truflað greiningu með MTT, annað hvort með beinni afoxun MTT í blátt formasan og/eða með litatruflun ef prófunaríðefnið gleypir í sig, annað hvort frá náttúrunnar hendi eða vegna meðhöndlunar, á sama ljósþéttnisviði og formasan (570 ± 30 nm, aðallega blá og fjólublá íðefni). Nota skal viðbótarsamanburði til að greina og leiðrétta hugsanlega truflun þessara prófunaríðefna, s.s. samanburðinn fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðinn fyrir ósértæka litun (NSC) (sjá 26. og 30. lið). Þetta skiptir einkum máli þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af vefnum eða þegar það gengur inn í húðþekjuna og finnst því í vefjunum þegar prófun á lífvænleika MTT er gerð. Í stöðluðu verklagsreglunum fyrir prófunarlíkönin (34.–37. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig unnt er að leiðrétta beina afoxun MTT og truflanir frá litunarefnum.

26. Til að greina beina MTT-afoxara skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreitt MTT-æti (34.–37. heimild). Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT-litinn beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni á dauða húðþekju, óháð því hvort notuð er stöðluð ljósþéttn-igleypnimæling eða litrófsmæliaðferð með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun. Í þessari viðbótarathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig svipað magn prófunaríðefnis og lífvænlegur vefur. Hvert íðefni sem afoxar MTT er sett á a.m.k. tvö samhliða sýni úr dauðum vef í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir alla prófunina á húðætingu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá MTT-afoxara, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar afoxunar MTT sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama MTT-afoxara, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSMTT).

27. Til að greina hugsanlega truflun af lituðum prófunaríðefnum eða prófunaríðefnum sem litast þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól og til að ákvarða hvort þörf sé á viðbótarsamanburðum skal framkvæma tíðnirófsgreiningu prófunaríðefnis í vatni (umhverfi á meðan á váhrifum stendur) og/eða ísóprópanóli (útdráttarlausn). Ef prófunaríðefnið í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig ljós á sviðinu 570 ± 30 nm, ætti að framkvæma frekari

samanburði með litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti/-útháþrýstivökvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 30. og 31. lið). Þegar mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) er gerð er hvert truflandi litaða prófunaríðefni sett á minnst tvö lífvænleg samhliða vefjasýni í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir alla prófunina á húðætingu en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun ($NSC_{lifandi}$). Samanburður $NSC_{lifandi}$ skal gerður samskeiða í hverjum váhrifatíma fyrir hvert litað prófunaríðefni (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður með MTT-lausn, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar, sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{lifandi}$).

28. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði beinni afoxun MTT (sjá 26. lið) og litatruflun (sjá 27. lið), er þörf á þriðju gerð af samanburði, auk samanburðar fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðar $NSC_{lifandi}$ sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni). Þetta á yfirleitt við um dökklituð prófunaríðefni sem trufla greiningu með MTT (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 26. lið. Þessi prófunaríðefni geta bundist bæði lifandi og dauðum vef og því getur samanburður með ósértækri afoxun MTT ekki eingöngu leiðrétt hugsanlega beina afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnis við dauðan vef. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun, þar eð samanburður $NSC_{lifandi}$ leiðréttir þegar litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnisins við lifandi vef. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu litatruflunar þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef ($NSC_{dauður}$). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á minnst tvö samhliða sýni úr dauðum vef í hverjum váhrifatíma, sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur. Stakur samanburður $NSC_{dauður}$ nægir fyrir hvert prófunaríðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru, en skal gerður samskeiða samanburði með ósértækri afoxun MTT og, ef unnt er, með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT, að frádregnu $\%NSC_{lifandi}$, að viðbættu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{dauður}$).

29. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértækar litatruflanir geta valdið því að aflestur vefjaútdráttar á litrófsmælinum verði ofan línuleikasviðs. Á þeim grundvelli skal hver rannsóknarstofa ákvarða línuleikasvið fyrir sinn litrófsmæli með MTT-formasani (CAS-númer 57360-69-7) af almennum markaði áður en prófun á prófunaríðefnum í eftirlitsskyni hefst. Einkum er mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) með litrófsmæli viðeigandi til að meta beina MTT-afoxara og prófunaríðefni sem trufla litun þegar ljósþéttni vefjaútdráttar, sem fæst með prófunaríðefninu án leiðréttingar vegna beinnar afoxunar MTT og/eða litatruflunar, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins eða þegar óleiðrétt hundraðshlutfall lífvænleika sem er fengið með prófunaríðefninu skilgreinir það þegar sem ætandi efni (sjá 35. og 36. lið). Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunaríðefni sem valda %NSMTT og/eða $\%NSC_{lifandi} > 50\%$ af neikvæða samanburðinum teknar með fyrirvara.

30. Að því er varðar lituð prófunaríðefni, sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) vegna of mikillar truflunar við greiningu með MTT, má nota staðgönguaðferðina litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun til að mæla MTT-formasan (sjá 31. lið) (37. heimild). Litrófsmælingakerfi með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasan frá prófunaríðefninu fyrir magnákvörðun (38. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á $NSC_{lifandi}$ eða $NSC_{dauðum}$ samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Engu að síður skal nota samanburði fyrir ósértæka afoxun MTT ef grunur leikur á að prófunaríðefnið sé beinn afoxari MTT eða ef litur þess hamlar mati á getu til beinnar afoxunar MTT (eins og lýst er í 26. lið). Þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundraðshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunaríðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar sem fæst

með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta beina afoxara MTT, sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljósþéttni (með notkun staðlaðrar ljósþéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.

31. Litrófsmælingu með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun má einnig nota með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, efni sem afoxa MTT-litarefni og efni sem gera það ekki) til að mæla MTT-formasan (38. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun skal sýna fram á hæfi litrófsmælingakerfisins með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun áður en það er notað til að magngreina MTT-formasan úr vefjaútdrætti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirnar séu uppfylltar fyrir staðlaða mæliþætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (38. og 39. heimild). Þessir helstu mæliþættir og samþykktarviðmiðanirnar þeirra eru sýnd í 4. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirnar, sem eru skilgreindar í 4. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

32. Í hverri prófunaraðferð þar sem fullgilt líkön með endurgerðri húðþekju manns eru notuð skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæða samanburðinum, sýna ljósþéttni sem endurspeglar gæði vefjanna, eins og lýst er í töflu 2, og skulu ekki vera undir rannsóknarsögulega fastsettum mörkum. Vefir sem eru meðhöndlaðir með jákvæða samanburðinum, þ.e. ísediki eða 8N KOH, skulu endurspegla getu vefja til að sýna svörun við ætandi íðefni við skilyrði prófunarlíkansins (sjá 2. viðbæti). Breytileikinn milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefninu og/eða samanburðaríðefnum skal vera innan ásættanlegra marka krafnanna fyrir hvert fullgilt líkan með endurgerðri húðþekju manns (sjá 2. viðbæti) (t.d. skal mismunurinn í breytileika milli þessara tveggja samhliða vefjasýna ekki fara yfir 30%). Ef annað hvort neikvæði eða jákvæði samanburðurinn í keyrslu lendir utan ásættanlegs sviðs telst keyrslan ekki hæf og skal hún endurtekin. Ef breytileiki prófunaríðefnis er utan skilgreinds sviðs skal endurtaka prófunina.

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

33. Nota skal ljósþéttnigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, til að reikna út lífvænleika í hundraðshlutum í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er fastsettur við 100%. Ef litrófsmæling með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun er notuð er hundraðshlutfall lífvænleika reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans sem fæst með lifandi vef, sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Þröskuldsgildi fyrir hundraðshluta lífvænleika frumna, sem greinir ætandi prófunaríðefni frá óætandi prófunaríðefnum (eða greinir milli mismunandi undirundirflokka ætandi efna), eru skilgreind hér fyrir neðan í 35. og 36. lið fyrir hvert prófunarlíkan sem þessi prófunaraðferð nær yfir og skulu notuð við túlkun á niðurstöðunum.

34. Stök prófunarkeyrsla á a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum ætti að nægja ef niðurstaðan gefur ótvíræða flokkun prófunaríðefnisins. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhliða mælingum, má taka til athugunar að framkvæma aðra keyrslu, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum tveimur.

35. Spálíkanið fyrir EpiSkin™-líkanið til prófunar á húðætingu (9., 34. og 22. heimild), sem tengist flokkunarkerfi HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, er sýnt í töflu 4:

Tafla 4

Spálíkan EpiSkin™

Lífvænleiki mældur eftir váhrifatímapunktum (t=3, 60 og 240 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
< 35% eftir váhrif í 3 mín.	***Ætandi:*** • Valkvæður undirundirflokkur 1A (*)
≥ 35% eftir váhrif í 3 mín. **OG** < 35% eftir váhrif í 60 mín. **EÐA** ≥ 35% eftir váhrif í 60 mín. **OG** < 35% eftir váhrif í 240 mín.	***Ætandi:*** • Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
≥ 35% eftir váhrif í 240 mín.	**Óætandi**

(*) Samkvæmt gögnum sem aflað var með það fyrir augum að meta hvort prófunarlíkönin með endurgerðri húðþekju manns nýtist til að styðja undirflokkun var sýnt fram á að u.þ.b. 22% niðurstaðna úr prófunarlíkaninu EpiSkin™, sem sýndu undirundirflokk 1A, gætu í raun verið efni/blöndur í undirundirflokki 1B eða 1C (þ.e. of há flokkun) (sjá 3. viðbæti).

36. Spálíkönin fyrir líkönin til prófunar á húðætingu, EpiDerm™ SCT (10., 23. og 35. heimild), SkinEthic™ RHE (17., 18., 23. og 36. heimild) og epiCS® (16., 23. og 37. heimild), sem tengjast flokkunarkerfi HSK SÞ/reglugerðinnni um flokkun, merkingu og pökkun, eru sýnd í töflu 5:

Tafla 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE og epiCS®

Lífvænleiki mældur eftir váhrifatímapunktum (t=3 og 60 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
SKREF 1 fyrir EpiDerm™ SCT, fyrir SkinEthic™ RHE og epiCS®	
< 50% eftir váhrif í 3 mín.	***Ætandi***
≥ 50% eftir váhrif í 3 mín. **OG** < 15% eftir váhrif í 60 mín.	***Ætandi***
≥ 50% eftir váhrif í 3 mín. **OG** ≥ 15% eftir váhrif í 60 mín.	**Óætandi**
SKREF 2 fyrir EpiDerm™ SCT - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 25% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *

Lífvænleiki mældur eftir váhrifatímapunktum (t=3 og 60 mínútur)	Spá sem þarf að hafa í huga
SKREF 1 fyrir EpiDerm™ SCT, fyrir SkinEthic™ RHE og epiCS®	
≥ 25% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
SKREF 2 fyrir SkinEthic™ RHE - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 18% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *
< 18% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C
SKREF 2 fyrir epiCS® - fyrir efni/blöndur sem eru greind sem ætandi í skrefi 1	
< 15% eftir váhrif í 3 mín.	Valkvæður undirundirflokkur 1A *
≥ 15% eftir váhrif í 3 mín	Samsetning valkvæðra undirundirflokka 1B og 1C

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

37. Setja skal gögn fyrir samhliða vefjasýni innan hverrar prófunar (t.d. ljósþéttnigildi og reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir hvert prófunaríðefni, auk flokkunar) fram í töflu, þ.m.t. gögn úr endurteknum tilraunum, ef við á. Auk þess skal setja fram meðaltal, lífvænleikasvið og frávikstuðla milli samhliða vefjasýna fyrir hverja prófun. Víxlverkanir við MTT-hvarfmiðil með beinum MTT-afoxurum eða lituðum prófunaríðefnum skulu tilgreindar fyrir hvert prófað íðefni.

Prófunarskýrsla

38. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunar- og samanburðaríðefni:

— efni með einum efnisþætti: 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 blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,

— meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,

— geymsluskilyrði.

Líkan með endurgerðri húðþekju manns og aðferðarlýsing sem er notuð ásamt rökstuðningi fyrir valinu (ef við á)

Prófunarskilyrði:

— líkan með endurgerðri húðþekju manns sem er notað (þ.m.t. númer framleiðslulotu),

— kvörðunarupplýsingar um mælibúnaðinn (t.d. litrófsmælir), bylgjulengd og bandsía (ef við á) til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar,

— lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan,

— lýsing á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun, ef við á,

— heildarupplýsingar til stuðnings notkun á tilteknu líkani með endurgerðri húðþekju manns, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:

  i. lífvænleiki,

  ii. tálmavirkni,

  iii. formfræði,

  iv. samanburðarnákvæmni og forspárgeta,

  v. gæðaeftirlit með líkaninu,

— tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal felast, án þess þó að einskorðast við það, ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur,

— sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglulega notkun með því að prófa hæfnisefnin.

Prófunaraðferð:

— upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð (þ.m.t. skolunaraðferðir sem eru notaðar eftir váhrifatímabilið),

— skammtar prófunaríðefnis og samanburðaríðefnis sem eru notaðir,

— lengd váhrifatímabils eða váhrifatímabila og hitastig við váhrif,

— tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á,

— fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notuð fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og ósértæk afoxun MTT, $NSC_{lifandi}$ og $NSC_{dauður}$, ef við á) í hverjum váhrifatíma,

— lýsing á ákvörðunarviðmiðunum/spálíkani sem er notað, á grundvelli líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað,

— lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni (þ.m.t. skolunaraðferðum).

Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir

— meðalgildi fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna,

— ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð,

— ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

Niðurstöður:

— töflusetning gagna fyrir stök prófunaríðefni og staka samanburði, fyrir hvert váhrifatímabil, hverja keyrslu og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljósþéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, hundraðshlutfall lífvænleika vefja, meðalhundraðshlutfall lífvænleika vefja, mismunur milli samhliða sýna, staðalfrávik og/eða frávikssstuðlar, ef við á,

— ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT og/eða prófunaríðefni til litunar, þ.m.t. ljósþéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, $\%NSC_{lifandi}$, $\%NSC_{dauður}$, mismunur milli samhliða vefjasýna, staðalfrávik og/eða frávikssstuðlar (ef við á), og endanlegt rétt hundraðshlutfall lífvænleika vefja,

— niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðaríðefnunum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir,

— lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,

— afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Ályktanir

HEIMILDIR

1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.

3) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðætingu.

4) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð *í glasi* við prófun með tálma úr himnu.

5) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðertingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns.

6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6. ATLA* 23:219-255.

8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter 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. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* Í: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Aðgengilegt á: [http://www.fda.gov/downloads/ Drugs/Guidances/ucm070107.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 (25. heimild).

Lífvænleiki frumna: Mæliþáttur sem mælir heildarvirkni frumuhóps, t.d. getu frumubundinna vetnissvipta í hvatberum til að afoxa líflitinn MTT (3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár) sem, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, samsvarar heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

Íðefni: Efni eða blanda.

Samsvörun: Samsvörun er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (25. heimild).

ET_{50}: Hægt að meta með ákvörðun á þeim váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika frumu um 50% við notkun viðmiðunaríðefnis við tilgreindan, fastan styrk, sjá einnig IC_{50}.

HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á íðefnum): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (1. heimild).

HPLC: Háþrýstivökvaskiljun.

IATA: Samþættar aðferðir við prófun og mat.

IC_{50}: Hægt að meta með ákvörðun á þeim styrk viðmiðunaríðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC_{50}) eftir fastan váhrifatíma, sjá einnig ET_{50}.

Ótakmarkaður skammtur: Það magn prófunaríðefnis sem er borið á húðþekjuna og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð húðþekjunnar fullkomlega og jafnt.

Blanda: Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í.

Efni með einum efnisþætti: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

MTT: 3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

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.

NC: Óætandi.

Samanburður $NSC_{dauður}$: Samanburður fyrir ósértæka litun í dauðum vef.

Samanburður $NSC_{lifandi}$: Samanburður fyrir ósértæka litun í lifandi vef.

NSMTT: Ósértæk afoxun MTT.

OD: Ljósþéttni

PC: 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.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (25. heimild).

Gildi: Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (25. 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 samanburðar-nákvæmni (25. heimild).

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburði.

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 (25. heimild).

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

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 (25. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UPLC: Úthá þrýstivökvaskiljun.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

2. viðbætir

HELSTU ÞÆTTIR PRÓFUNARLÍKANA MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS SEM HAFA VERIÐ FULLGILT TIL PRÓFUNAR Á HÚÐÆTINGU

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Yfirborð líkans	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Fjöldi samhliða vefjasýna	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma	2–3 í hverjum váhrifatíma	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma	Minnst 2 í hverjum váhrifatíma
Meðhöndlunarskammtar og notkun	Vökvar og seigfljótandi efni: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Föst efni: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl-lausn (9 g/l) Vaxkennd/límkennd efni: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) með nælonmöskva	Vökvar: 50 µl (79,4 µl/cm^2) með eða án nælonmöskva *Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöskva fyrir prófun:* Hálfföst efni: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Föst efni: 25 µl H_2O (eða meira ef nauðsyn krefur) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vaxkennd efni: flöt flipalaga stykki, um 8 mm í þvermál, sett ofan á vefinn sem er bleyttur með 15 µl H_2O.	Vökvar og seigfljótandi efni: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) með nælonmöskva *Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöskva fyrir prófun:* Föst efni: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vaxkennd/límkennd efni: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) með nælonmöskva	Vökvar: 50 µl (83,3 µl/cm^2) með nælonmöskva *Samrýmanleiki prófunaríðefnis við nælonmöskva fyrir prófun:* Hálfföst efni: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Föst efni: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (eða meira ef nauðsyn krefur) Vaxkennd efni: flöt kökulaga stykki, um 8 mm í þvermál, sett ofan á vefinn sem er bleyttur með 15 µl H_2O.

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Forathugun vegna beinnar afoxunar MTT	50 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml lausn í 180 ± 5 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drekkt í vatni	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu	40 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu
Forathugun vegna litatruflunar	10 µl (vökvi) eða 10 mg (fast efni) + 90 µl H_2O blandað í 15 mín við stofuhita → ef lausnin litast skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 300 µl H_2O í 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin litast skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef	40 µl (vökvi) eða 20 mg (fast efni) + 300 µl H_2O blandað í 60 mín við stofuhita → ef prófunaríðefnið er litað skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef	50 µl (vökvi) eða 25 mg (fast efni) + 300 µl H_2O í 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig → ef lausnin litast skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef
Váhrifatími og hitastig	3 mín, 60 mín (± 5 mín) og 240 mín (± 10 mín) Í loftræstum skáp, stofuhiti (18–28 °C)	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig	3 mín við stofuhita og 60 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig
Skolun	25 ml 1x fosfatstillt saltlausn (2 ml/keyrsla)	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn	20 sinnum með stöðugu léttu streymi af 1x fosfatstilltri saltlausn

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Neikvæður samanburður	50 µl NaCl lausn (9 g/l) Prófað í hverjum váhrifatíma	50 µl H_2O Prófað í hverjum váhrifatíma	40 µl H_2O Prófað í hverjum váhrifatíma	50 µl H_2O Prófað í hverjum váhrifatíma
Jákvæður samanburður	50 µl ísedik Prófað í aðeins 4 klukkustundir	50 µl 8N KOH Prófað í hverjum váhrifatíma	40 µl 8N KOH Prófað í aðeins 1 klukkustund	50 µl 8N KOH Prófað í hverjum váhrifatíma
MTT-lausn	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-ræktunartími og hitastig	180 mín (± 15 mín) við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig	180 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig	180 mín við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig
Útdráttarleysir	500 µl sýrt ísóprópanól (0,04 N vetnisklóríð í ísóprópanóli) (einangraður vefur, allur á kafi)	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskots-bolla)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskotsbolla)	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innskotsbolla)
Útdráttartími og -hitastig	Yfir nótt við stofuhita, varið ljósi	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita	Yfir nótt án hristings við stofuhita eða í 120 mín með hristingi (~ 120 snún./mín.) við stofuhita

Þættir prófunarlíkans	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mæling á ljósþéttni	570 nm (545–595 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (eða 540 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsíu	540–570 nm án viðmiðunarsíu
Gæðaeftirlit með vef	18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 4,08 klst. ≤ ET_{50} ≤ 8,7 klst.	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 4,0 klst. ≤ ET_{50} ≤ 10,0 klst.	Meðhöndlun með 1% Triton X-100 2,0 klst. ≤ ET_{50} ≤ 7,0 klst.
Viðmiðanir fyrir ásættanleika	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (NaCl) skal vera ≥ 0,6 og ≤ 1,5 í hverjum váhrifatíma 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 4 klukkustundir með jákvæða samanburðinum (ísedik), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 20% 3. Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljósþéttni ≥ 3,0, skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H_2O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 2,8 í hverjum váhrifatíma 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 15% 3. Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika skal frávikstuðullinn milli samhliða vefjasýna vera 30%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H_2O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 3,0 í hverjum váhrifatíma 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund (og í 4 klukkustundir, ef við á) með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 15% 3. Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljósþéttni ≥ 3,0 skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði (H_2O) skal vera ≥ 0,8 og ≤ 2,8 í hverjum váhrifatíma 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 1 klukkustund með jákvæða samanburðinum (8N KOH), gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera 20% 3. Á bilinu 20–100% fyrir lífvænleika og fyrir ljósþéttni ≥ 3,0 skal mismunur á lífvænleika milli samhliða vefjasýnanna tveggja ekki vera meiri en 30%

3. viðbætir

ÁRANGUR PRÓFUNARLÍKANANNA VARÐANDI UNDIRFLOKKUN

Taflan hér fyrir neðan sýnir árangur prófunarlíkananna fjögurra sem er reiknaður út á grundvelli 80 íðefna sem prófunarhönnuðirnir fjórir hafa prófað. Skrifstofa Efnahags- og framfarastofnunarinnar sá um útreikningana og þeir voru endurskoðaðir og samþykktir af undirhópi sérfræðinga (21. og 23. heimild).

Með prófunarlíkönunum EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ og epiCS® er hægt að undirflokka (þ.e. greina á milli 1A og 1B/1C og óætandi efna (NC)).

Árangur, tíðni of hárrar flokkunar, tíðni of lágrar flokkunar og nákvæmni (forspárgeta) prófunarlíkananna fjögurra á grundvelli 80 íðefna, öll prófuð í 2 eða 3 keyrslum í hverju prófunarlíkani:

TÖLFRÆÐILEGAR UPPLÝSINGAR UM SPÁR FENGNAR FYRIR ÖLL ÍÐEFNIN

(n=80 íðefni prófuð í 2 óháðum keyrslum fyrir epiCS® eða 3 óháðum keyrslum fyrir EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ og SkinEthic™ RHE, þ.e. 159 (*) eða 240 flokkanir, eftir því sem við á)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Of háar flokkanir:				
1B/1C flokkað of hátt sem 1A	21,50%	29,0%	31,2%	32,8%
NC flokkað of hátt sem 1B/1C	20,7%	23,4%	27,0%	28,4%
NC flokkað of hátt sem 1A	0,00%	2,7%	0,0%	0,00%
Flokkað of hátt sem ætandi	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Heildarhlutfall of hárrar flokkunar (allir flokkar)	**17,9%**	**23,3%**	**24,5%**	**25,8%**
Of lágar flokkanir:				
1A flokkað of lágt sem 1B/1C	16,7%	16,7%	16,7%	12,5%
1A flokkað of lágt sem NC	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B/1C flokkað of lágt sem NC	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Heildarhlutfall of lágrar flokkunar (allir flokkar)	**3,3%**	**2,5%**	**5,4%**	**4,4%**
Réttar flokkanir:				
1A rétt flokkað	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B/1C rétt flokkað	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NC rétt flokkað	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Heildarnákvæmni	**78,8%**	**74,2%**	**70%**	**69,8%**

NC: Óætandi

(*) eitt íðefni var prófað einu sinni í epiCS® vegna skorts á aðgengi (23. heimild)

4. viðbætir

Helstu mæliþættir og samþykktarviðmiðanir fyrir hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/úthá þrýstivökvaskiljun til mælingar á MTT-formasani sem er dregið úr vef endurgerðrar húðþekju manns

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (37. og 38. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísi	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar)	$Svæði_{truflun} \leq 20\%$ af $svæði_{LLOQ}$ (1)
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n=5)	FS ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	% frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=5)	85% ≤ áhrif efniviðarins ≤ 115%
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ (2)	$Svæði_{truflun} \leq 20\%$ af $svæði_{LLOQ}$
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrír óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanól í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml). Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	Kvörðunarferlar: % frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ Gæðaeftirlit: % frávika ≤ 15% og FS ≤ 15%
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)	
Skammtíma stöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika ≤ 15%
Langtímastöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við tiltekið hitastig (t.d. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	% frávika ≤ 15%

(1) LLOQ: Neðri magngreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Efri magngreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærri en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við, þ.e. 200 µg/ml.“

7) Í stað kafla B.46 í B-hluta kemur eftirfarandi:

‘B.46 ***IN VITRO* SKIN IRRITATION: „B. 46 RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐERTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (2015). Húðerting er skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir og getur gengið til baka [eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK)] (1. heimild) og reglugerð Evrópusambandsins (ESB) 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]). Þessi prófunaraðferð er aðferð *í glasi* sem hægt er að nota til hættugreiningar á ertandi íðefnum (efnum og blöndum) í samræmi við 2. undirflokk HSK SÞ/reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun (2. heimild). Á svæðum sem hafa ekki samþykkt hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SÞ (vægt ertandi efni) er einnig hægt að greina óflokkuð íðefni með þessari prófunaraðferð. Með hliðsjón af reglurammanum og flokkunarkerfinu sem notað er má því nota þessa prófunaraðferð til að ákvarða húðertingu íðefna annað hvort sem sjálfstæða staðgönguprófun á húðertingu *í lífi* eða sem staðgönguprófun að hluta til innan prófunaráætlunar (3. heimild).

2. Mat á húðertingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra [prófunaraðferð B.4, sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir, upphaflega samþykkt árið 1981 og endurskoðuð árin 1992, 2002 og 2015] (4. heimild). Til prófunar á húðætingu hafa þrjár fullgiltar prófunaraðferðir *í glasi* verið samþykktar í Evrópusambandinu sem prófunaraðferð B.40 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir), prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir) og prófunaraðferð B.65 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) (5.–7. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfararstofnunar um samþættar aðferðir við prófun og mat varðandi húðætingu og húðertingu er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og ætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum (3. heimild).

3. Þessi prófunaraðferð varðar húðertingu sem endapunkt með tilliti til heilbrigðis manna. Hún byggist á prófunarkerfi *í glasi* með endurgerðri húðþekju manns (RhE), sem líkir nákvæmlega eftir lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum efri hluta mannshúðar, þ.e. húðþekjunnar. Í prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns eru óummyndaðar hyrnisfrumur manns notaðar sem frumugjafi til að endurgera líkan úr húðþekju með dæmigerðri vefjafræði og frumuuppbyggingu. Nothæfisstaðlar eru tiltækir til að auðvelda fullgildingu og mat á samsvarandi og breyttum prófunaraðferðum sem byggjast á endurgerðri húðþekju manns í samræmi við meginreglurnar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (8. og 9. heimild). Samsvarandi viðmiðunarregla um prófanir var upphaflega samþykkt árið 2010, uppfærð árið 2013 til að hún næði yfir fleiri líkön með endurgerðri húðþekju manns og uppfærð árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og innleiða notkun annarrar aðferðar til að mæla lífvænleika.

4. Rannsóknum á forfullgildingu, bestun og fullgildingu er lokið fyrir fjögur líkön til prófunar *í glasi* sem fást á almennum markaði (10.–28. heimild) sem byggjast á prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns (næmi 80%, sértæki 70% og nákvæmni 75%). Þessi prófunaraðferð nær yfir þessi fjögur prófunarlíkön og eru þau skráð í 2. viðbæti þar sem einnig eru veittar upplýsingar um gerð fullgildingarrannsóknarinnar sem notuð var til að fullgilda viðkomandi prófunaraðferðir. Eins og fram kemur í 2. viðbæti hefur fullgilta viðmiðunaraðferðin verið notuð til að þróa fyrirliggjandi prófunaraðferð og nothæfisstaðlana (8. heimild).

5. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófunarlíkön sem eru fullgilt samkvæmt nothæfisstöðlunum (8. heimild) ef prófunarlíkönin hafa verið endurskoðuð og samþykkt af Efnahags- og framfarastofnuninni. Prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir og samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu um prófanir er unnt að nota jafnt til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunaraðferðum *í glasi* á húðertingu og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna.

6. Skilgreiningar á hugtökum sem eru notuð í þessu skjali eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Sú takmörkun er á prófunaraðferðinni, eins og sýnt er fram á í víðtæku framskyggnu fullgildingarrannsókninni til mats og lýsingar á prófunaraðferðum með endurgerðri húðþekju manns, að hún gefur ekki færi á flokkun íðefna í valkvæðan 3. undirflokk hnattsamræmds kerfis SÞ (vægt ertandi efni) (1. heimild). Notkun þessarar prófunaraðferðar ákvarðast því af regluramma aðildarríkjanna. Að því er varðar Evrópusambandið þá er ekki búið að taka 3. undirflokk upp í reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun. Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (3. heimild). Viðurkennt er að notkun mannshúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu.

([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).

8. Þessi prófunaraðferð varðar húðertingu sem endapunkt með tilliti til heilbrigðis manna. Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðætingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.40a (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir) um húðætingu byggist á sama prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns þótt notuð sé önnur aðferðarlýsing (6. heimild). Þessi prófunaraðferð er byggð á líkönum með endurgerðri húðþekju manns sem í eru notaðar hyrnisfrumur manns og eru því dæmigerð *í glasi* fyrir marklíffæri dýrategundarinnar sem miðað er við. Auk þess nær hún yfir upphafsstig keðjuverkunar eða gangvirki bólgunnar (frumu- og vefjaskemmdir sem leiða af sér staðbundinn skaða) sem verður meðan á ertingu *í lífi* stendur. Margvísleg íðefni hafa verið prófuð við fullgildinguna, sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð, og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar náði yfir alls 58 íðefni (16., 18. og 23. heimild). Prófunaraðferðin á við um föst efni, vökva, hálfföst efni og vaxkennd efni. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsókn (29. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með tækninni sem notar endurgerða húðþekju manns er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.

9. 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. Þar eð blöndur ná yfir breitt svið flokka og samsetninga og sem stendur eru aðeins takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi um prófanir á blöndum skal þó, í þeim tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á ónothæfi prófunaraðferðarinnar varðandi tiltekinn flokk af blöndum (t.d. áætlun fylgt eins og mælt er með í Eskes *et al.* 2012 (30. heimild)), ekki nota prófunaraðferðina fyrir þann tiltekna flokk blandna. Einnig skal gæta varúðar ef í ljós kemur að tilteknir íðefnaflokkar eða eðlisefnafræðilegir eiginleikar eigi ekki við um fyrirliggjandi prófunaraðferð.

10. Prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan og prófunaríðefni sem geta afoxað MTT-líflitinn beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika frumna og þörf er á aðlöguðum samanburði til leiðréttingar (sjá 28.–34.lið).

11. Stök prófunarkeyrsla á þremur samhliða vefjasýnum ætti að nægja ef flokkun prófunarefnisins er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhliða mælingum og/eða meðalhundraðshluti lífvænleika er jafnt og 50 ± 5%, skal tekið til athugunar að gera aðra keyrslu, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum tveimur.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. Prófunarefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan með endurgerðri húðþekju manns sem samanstendur af óumbreyttum hyrnisfrumum manns sem hafa verið ræktaðar til að mynda marglaga, mjög aðgreint líkan af húðþekju manns. Líkanið samanstendur af grunn-, þyrni- og kornalagi og marglaga hornlagi sem í eru, milli frumna, fitulagaþynnur sem eru dæmigerðar fyrir helstu flokka lípíða, hliðstæðum þeim sem finnast *í lífi*.

13. Húðerting af völdum íðefna, sem kemur aðallega fram sem hörundsroði og bjúgur, er afleiðing keðjuverkandi atburða sem hefjast þegar íðefni fara í gegnum hornlag húðar og kunna að valda skaða á undirliggjandi lögum hyrnisfrumna og öðrum húðfrumum. Skömmu frumurnar geta annað hvort látið frá sér bólguvaldandi milliliði eða leitt til keðjuverkunar bólgu sem hefur einnig áhrif á frumurnar í leðurhúðinni, einkum frumurnar í uppistöðuvef og innþekju blóðæða. Það er útvíkkun og aukið gegndræpi frumnanna í innþekjunni sem framkallar hörundsroðann og bjúginn (29. heimild). Þegar engin æðun er fyrir hendi í prófunarkerfinu *í glasi* mæla prófunaraðferðirnar með endurgerðri húðþekju manns einkum upphafsatburðina í keðjuverkuninni, þ.e. frumu- eða vefjaskemmdir (16. og 17. heimild), með því að nota lífvænleika frumna sem mælikvarða.

14. Lífvænleiki frumna í líkönum með endurgerðri húðþekju manns er mældur með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár, CAS-númer 298-93-1] í blátt formasansalt sem er mælt megindlega eftir útdrátt úr vefjunum (31. heimild). Ertandi íðefni eru greind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna niður fyrir skilgreind viðmiðunargildi (þ.e. ≤ 50% fyrir 2. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Íðefni, sem framkalla lífvænleika í frumum sem er meiri en skilgreint viðmiðunargildi, má líta á sem efni sem eru ekki ertandi (þ.e. > 50% utan flokka), með hliðsjón af regluramma og notkunarsviði prófunaraðferðarinnar.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

15. Áður en einhver af fullgiltu prófunarlíkönunum fjórum, sem fylgja þessari prófunaraðferð (2. viðbætir), eru tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum tíu sem tilgreind eru í töflu 1. Ef t.d. skráð efni er ekki tiltækt er heimilt að nota annað efni ef fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* liggja fyrir um það (t.d. af skránni yfir viðmiðunaríðefni (8. heimild)), að því tilskildu að sömu valviðmiðunum, eins og lýst er í töflu 1, sé beitt. Ef annað hæfisefni er notað skal það rökstutt.

16. Mælt er með því að notendur sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda líkansins með endurgerðri húðþekju manns, til að sýna fram á hæfni. Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófunaraðferð hefur verið notuð á árangursríkan hátt og hæfni í notkun hennar hefur verið náð og sýnt fram á hana þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófunaraðferð er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

Tafla 1

Hæfnisefni ([1])

Efni	CAS-nr.	Stig *í lífi* ([2])	Eðlisástand	Undirflokkur HSK SÞ
ÓFLOKKUÐ EFNI (UTAN FLOKKA HSK SÞ)				
naftalínediksýra	86-87-3	0	Fast efni	Utan flokka
ísóprópanól	67-63-0	0,3	Vökvi	Utan flokka
metýlsterat	112-61-8	1	Fast efni	Utan flokka
heptýlbútýrat	5870-93-9	1,7	Vökvi	Utan flokka (*valkvæður 3. undirflokkur*) ([3])
hexýlsalisýlat	6259-76-3	2	Vökvi	Utan flokka (*valkvæður 3. undirflokkur*) ([3])
FLOKKUÐ EFNI (2. UNDIRFLOKKUR HSK SÞ)				
sýklamenaldehýð	103-95-7	2,3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-brómhexan	111-25-1	2,7	Vökvi	Undirflokkur 2
kalíumhýdroxíð (5% vatnslausn)	1310-58-3	3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-metýl-3-fenýl-1-píperasín	5271-27-2	3,3	Fast efni	Undirflokkur 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vökvi	Undirflokkur 2

([1]) Hæfnisefnin eru hlutmengi efnanna sem eru notuð í fullgildingarrannsókninni og valið byggist á eftirfarandi viðmiðum: i. íðefnin fást á almennum markaði, ii. þau eru dæmigerð fyrir allt svið Draize-ertingarstiganna (frá ekki ertandi til mjög ertandi), iii. þau hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, iv. þau eru dæmigerð fyrir efnafræðilegu virknina sem notuð er í fullgildingarferlinu í glasi, v. þau hafa gefið samanburðarnákvæmar niðurstöður í mörgum prófunum og mörgum rannsóknarstofum, vi. spáð var rétt fyrir um þau *í glasi*, og vii. þau hafa ekki mjög mikla eiturhrifaeiginleika (t.d. krabbameinsvaldandi áhrif eða eiturhrif á æxlunarfæri) og þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.

([2]) Stig *í lífi* í samræmi við prófunaraðferð B.4 (4. heimild).

([3]) Í þessari prófunaraðferð er litið á hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SÞ (vægt ertandi efni) (1. heimild) sem utan flokka.

VERKFERLI

17. Eftirfarandi er lýsing á þáttum og tilhögun prófunaraðferðar með endurgerðri húðþekju manns til að meta húðertingu (sjá einnig 3. viðbæti að því er varðar mæliþætti í tengslum við hvert prófunarlíkan). Tiltækar eru staðlaðar verklagsreglur fyrir líkönin fjögur sem eru í samræmi við þessa prófunaraðferð (32.–35. heimild).

ÞÆTTIR Í PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS

Almenn skilyrði

18. Nota skal óumbreyttar hyrnisfrumur manns til að endurgera þekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum (grunnlag, þyrnilag, kornalag) undir virku hornlagi. Hornlagið skal vera marglaga, með grundvallarfitusniði til að veita virkan, traustan tálma gegn því að frumudrepandi viðmiðunaríðefni, t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það. Sýna skal fram á tálmavirknina og hana má meta, annaðhvort með því að ákvarða við hvaða styrk viðmiðunaríðefni dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC_{50}) eftir fastan váhrifatíma eða með því að ákvarða hve langan váhrifatíma þarf til að draga úr lífvænleika frumna um 50% (ET_{50}) þegar viðmiðunaríðefnið er sett á í tilteknum, föstum styrk. Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lífvænlegum vef en það myndi skerða getu líkansins með endurgerðri húðþekju manns til að lýsa váhrifum á húð. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal vera laust við smit af völdum baktería, veira, berfryminga eða sveppa.

Virkniaðstæður

Lífvænleiki

19. Greiningin sem er notuð til að magngreina lífvænleika er greining með MTT-lit (31. heimild). Lífvænlegar frumur í vefjalíkani með endurgerðri húðþekju manns geta afoxað líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópanóli (eða svipuðum leysi). Ljósþéttni (OD) hreins útdráttarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. OD < 0,1. Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan með annað hvort staðalgleypni (ljósþéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (36. heimild). Notendur líkans með endurgerðri húðþekju manns skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota notaðs líkans með endurgerðri húðþekju manns uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljósþéttnigildi neikvæða samanburðarins (við aðstæður samkvæmt prófunaraðferðinni fyrir húðertingu). Ásættanlegt svið fyrir fullgiltu prófunarlíkönin fjögur með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er tilgreint í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun skal nota ljósþéttnisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Skjalfest skal að vefirnir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðum samanburði, séu stöðugir í ræktun (gefi svipaðar lífvænleikamælingar) meðan váhrifatímabil stendur yfir.

Tafla 2

Ásættanlegt svið ljósþéttnigilda neikvæðs samanburðar fyrir prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Tálmavirkni

20. Hornlagið og samsetning lípíðanna í því ætti að nægja til að koma í veg fyrir að frumudrepandi viðmiðunaríðefni, t.d. natríumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það, miðað við IC_{50} eða ET_{50} (tafla 3).

Formfræði

21. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á líkaninu með endurgerðri húðþekju manns til að sýna fram á að bygging hennar sé lík húðþekju manns (þ.m.t. marglaga hornlag húðar).

Samanburðarnákvæmni

22. Niðurstöður úr jákvæða og neikvæða samanburðinum skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni í langan tíma.

Gæðaeftirlit

23. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal eingöngu notað ef hönnuður eða birgir sýnir fram á að hver framleiðslulota líkana með endurgerðri húðþekju manns, sem er notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta *lífvænleiki* (19. liður), *tálmavirkni* (20. liður) og *formfræði* (21. liður) mestu máli. Notendur prófunaraðferðarinnar skulu fá gögn um þau atriði afhent svo þeir geti haft þær upplýsingar með í prófunarskýrslunni. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir IC_{50}) eða ET_{50}. Aðeins er hægt að samþykkja niðurstöður, sem fást með viðurkenndum vefjum, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um ertingarflokkun. Ásættanlegt svið fyrir prófunarlíkönin fjögur, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, eru gefin í töflu 3.

Tafla 3

Gæðaeftirlitsviðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslulota fyrir prófunarlíkönin sem þessi prófunaraðferð nær yfir

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM) (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (32. heimild).	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (33. heimild)	ET_{50} = 4,0 klst.	ET_{50} = 8,7 klst.
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34. heimild)	ET_{50} = 4,0 klst.	ET_{50} = 10,0 klst.
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati) (35. heimild).	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Prófunar- og samanburðaríðefni sett á

24. Nota skal a.m.k. þrjú samhliða sýni fyrir hvert prófunaríðefni og fyrir samanburðinn í hverri keyrslu. Nota skal nægilegt magn prófunaríðefnisins, bæði þegar um er að ræða fljótandi og föst íðefni, til að þekja yfirborð húðþekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt, þ.e. á bilinu 26 til 83 l/cm^2 eða mg/cm^2 (sjá 3. viðbæti). Ef um er að ræða föst íðefni skal væta yfirborð húðþekjunnar með afjónuðu eða eimuðu vatni áður en þau eru sett á til að tryggja góða snertingu prófunaríðefnisins við yfirborð húðþekjunnar. Prófa skal föst efni í fíngerðu duftformi þegar því verður við komið. Í sumum tilvikum er hægt að nota nælonmöskva til að auðvelda dreifingu (sjá 3. viðbæti). Í lok váhrifatímabils skal skola prófunaríðefnið vandlega af yfirborði húðþekjunnar með vatnskenndri jafnalausn eða 0,9% NaCl. Váhrifatímabilið er á bilinu 15–60 mínútur, með hliðsjón af því hvaða líkön með endurgerðri húðþekju manns eru notuð, og sýnið er látið standa við hitastigið frá 20–37 °C. Þessi váhrifatímabil og hitastig eru bestuð fyrir hverja einstaka prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns og eru dæmigerð fyrir mismunandi eðliseiginleika prófunarlíkananna (t.d. tálmavirkni) (sjá 3. viðbæti).

25. Nota skal samskeiða neikvæðan og jákvæðan samanburð í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (með neikvæða samanburðinum), tálmavirkni og næmi vefjanna, sem af henni leiðir (með jákvæða samanburðinum), séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Lagt er til að notað sé 5% natríumdódekýlsúlfat í vatnslausn við jákvæðan samanburð. Lagt er til að notað sé annaðhvort vatn eða fostfatjöfnuð saltlausn við neikvæðan samanburð.

Mælingar á lífvænleika frumna

26. Samkvæmt prófunaraðferðinni er nauðsynlegt að lífvænleikinn sé ekki mældur um leið og prófunaríðefnin hafa verið borin á heldur eftir að skolaður vefurinn hefur verið látinn standa í hæfilega langan tíma í nýju æti eftir meðhöndlunina. Á þeim tíma nær vefurinn bæði að jafna sig af vægt frumudrepandi áhrifum og greinileg, frumudrepandi áhrif koma í ljós. Við bestun tveggja prófunarlíkana með endurgerðri húðþekju manns, sem liggja til grundvallar þessari prófunaraðferð, reyndist best ef stöðutími eftir meðhöndlun var 42 klukkustundir (11.–15. heimild).

27. Greining með MTT er stöðluð megindleg aðferð sem skal nota til að mæla lífvænleika frumna í þessari prófunaraðferð. Hún samræmist notkun í þrívíðu vefjalíkani. Vefjasýnið er sett í MTT-litarlausn í hæfilegum styrk (t.d. 0,3–1 mg/ml) í 3 klukkustundir. Lífvænlegar frumur breyta MTT í blátt formasan. Útfellt, blátt formasan er svo dregið út úr vefnum með leysi (t.d. ísóprópanóli, súru ísóprópanóli) og formasanstyrkurinn er mældur með því að ákvarða ljósþéttni við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki ± 30 nm eða með litrófsmælingaraðferð með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun (sjá 34. lið) (36. heimild).

28. Ljósfræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins eða efnafræðileg verkun þess á MTT (t.d. geta íðefni komið í veg fyrir litarmyndunina eða snúið henni við sem og valdið henni) geta truflað greininguna og leitt til rangs mats á lífvænleika. Þetta getur gerst þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af vefnum eða ef það gengur inn í húðþekjuna. Ef prófunaríðefni hefur beina virkni á MTT-litinn (t.d. er afoxari MTT-litar), er litað frá náttúrunnar hendi eða litast við meðhöndlun vefjarins skal viðbótarsamanburði beitt til að greina og leiðrétta truflandi áhrif prófunaríðefnisins á aðferðina sem er notuð til mælinga á lífvænleika (sjá 29. og 33. lið). Í stöðluðu verklagsreglunum fyrir fullgiltu líkönin fjögur sem þessi prófunaraðferð nær yfir (32.–35. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig unnt er að leiðrétta beina afoxun MTT-litar og truflanir frá litarefnum.

29. Til að greina beina MTT-afoxara beint skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreidda MTT-litarlausn. Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT-litinn beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni ólífvænlegs vefjar endurgerðrar húðþekju manns, óháð því hvort notuð er stöðluð ljósþéttnigleypnimæling eða litrófsmæliaðferð með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun. Í þessari viðbótarathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig prófunaríðefnið á svipaðan hátt og lífvænlegur vefur. Hvert prófunaríðefni sem afoxar MTT-litinn er sett á a.m.k. tvö samhliða sýni úr dauðum vef sem gangast undir alla prófunaraðferðina til að fá ósértæka afoxun MTT (NSMTT) (32.–35. heimild). Stakur NSMTT-samanburður nægir fyrir hvert prófunaríðefni, án tillits til óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá MTT-afoxara, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar afoxunar MTT sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama MTT-afoxara, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSMTT).

30. Til að greina hugsanlega truflun af lituðum prófunaríðefnum eða prófunaríðefnum sem litast þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól og til að ákvarða hvort þörf sé á viðbótarsamanburðum skal framkvæma tíðnirófsgreiningu prófunaríðefnis í vatni (umhverfi á meðan á váhrifum stendur) og/eða ísóprópanóli (útdráttarlausn). Ef prófunaríðefnið í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig ljós á sviðinu 570 ± 30 nm, ætti að framkvæma frekari samanburði á litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 33. og 34. lið). Þegar mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) er gerð er hvert truflandi litaða prófunaríðefni sett á minnst tvö lífvænleg samhliða vefjasýni sem gangast undir alla prófunaraðferðina en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun ($NSC_{lifandi}$). Samanburður $NSC_{lifandi}$ skal gerður samskeiða prófuninni á litaða prófunaríðefninu og ef um er að ræða margar prófanir skal gera óháðan samanburð $NSC_{lifandi}$ fyrir hverja framkvæmda prófun (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður með MTT-lausn, að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{lifandi}$).

31. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði beinni afoxun MTT (sjá 29. lið) og litatruflun (sjá 30. lið), er þörf á þriðju gerð af samanburði, auk samanburðar fyrir ósértæka afoxun MTT og samanburðar $NSC_{lifandi}$ sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni). Þetta á yfirleitt við um dökklituð prófunaríðefni sem trufla greiningu með MTT (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 29. lið. Þessi prófunaríðefni geta bundist bæði lifandi og dauðum vef og því getur samanburður með ósértækri afoxun MTT ekki eingöngu leiðrétt hugsanlega beina afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnis við dauðan

vef. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun, þar eð samanburður $NSC_{lifandi}$ leiðréttir þegar litatruflun sem kemur til vegna bindingar prófunaríðefnisins við lifandi vef. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu litatruflunar þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef ($NSC_{dauður}$). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á minnst tvö samhliða sýni úr dauðum vef sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepi stendur. Stakur samanburður $NSC_{dauður}$ nægir fyrir hvert prófunaríðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru, en skal gerður samskeiða samanburði með ósértækri afoxun MTT og, ef unnt er, með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er síðan reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT, að frádregnu $\%NSC_{lifandi}$, að viðbættu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefninu og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{dauður}$).

32. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértækar litatruflanir geta valdið því að aflestur vefjaútdráttar á litrófsmælinum verði ofan línuleikasviðs. Á þeim grundvelli skal hver rannsóknarstofa ákvarða línuleikasvið fyrir sinn litrófsmæli með MTT-formasan (CAS-númer 57360-69-7) af almennum markaði áður en prófun á prófunaríðefnum í eftirlitsskyni hefst. Mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) með litrófsmæli er viðeigandi til að meta beina MTT-afoxara og prófunaríðefni sem trufla litun þegar ljósþéttni vefjaútdráttar, sem fæst með prófunaríðefninu án leiðréttingar vegna beinnar afoxunar MTT og/eða litatruflunar, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins eða þegar óleiðrétt hundraðshlutfall lífvænleika sem er fengið með prófunaríðefninu er þegar $\leq 50\%$. Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunaríðefni, sem valda %NSMTT og/eða $\%NSC_{lifandi} \geq 50\%$ af neikvæða samanburðinum, teknar með fyrirvara þar eð það er þröskuldsgildi sem er notað til að skilja á milli flokkaðra og óflokkaðra íðefna (sjá 36. lið).

33. Að því er varðar lituð prófunaríðefni, sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) vegna of mikillar truflunar við greiningu með MTT, má nota staðgönguaðferðina litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun til að mæla MTT-formasan (sjá 34. lið) (36. heimild). Litrófsmælingakerfi með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasan frá prófunaríðefninu fyrir magnákvörðun (36. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á $NSC_{lifandi}$ eða $NSC_{dauðum}$ samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Engu að síður skal nota samanburði fyrir ósértæka afoxun MTT ef grunur leikur á að prófunaríðefnið sé beinn afoxari MTT eða ef litur þess hamlar mati á getu til beinnar afoxunar MTT (eins og lýst er í 29. lið). Þegar litrófsmæling með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundraðshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunaríðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem hundraðshlutfall lífvænleika vefjar sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, að frádregnu %NSMTT. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta beina afoxara MTT, sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljósþéttni (með notkun staðlaðrar ljósþéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.

34. Litrófsmælingu með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun má einnig nota með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, efni sem afoxa MTT-litarefni og efni sem gera það ekki) til að mæla MTT-formasan (36. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun skal sýna fram á hæfi litrófsmælingakerfisins með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun áður en það er notað til að magngreina MTT-formasan úr vefjaútdrætti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirnar séu uppfylltar fyrir staðlaða mæliþætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (36. og 37. heimild). Þessir helstu mæliþættir og samþykktarviðmiðanirnar þeirra eru sýnd í 4. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirnar, sem eru skilgreindar í 4. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

35. Fyrir hverja prófunaraðferð með fullgiltum framleiðslulotum líkana með endurgerðri húðþekju manns (sjá 23. lið) skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæða samanburðinum, sýna ljósþéttni sem endurspeglar gæði vefjanna sem hafa farið gegnum öll skref sendingar- og viðtökuferlisins og alla meðhöndlun samkvæmt aðferðarlýsingu. Ljósþéttnigildi samanburðarins skulu ekki vera undir viðurkenndum, rannsóknarsögulegum mörkum. Á sama hátt skulu vefir sem eru meðhöndlaðir með jákvæða samanburðinum, þ.e. 5% natríumdódekýlsúlfati í vatnslausn, endurspegla getu þeirra til að sýna svörun við ertandi íðefni við skilyrði prófunaraðferðarinnar (sjá 3. viðbæti og, fyrir frekari upplýsingar, staðlaðar verklagsreglur fyrir prófunarlíkönin fjögur sem þessi viðmiðunarregla um prófanir nær yfir (32.–35. heimild)). Tengdar og viðeigandi mælingar á breytileika milli samhliða vefjasýna, þ.e. staðalfrávik (SD), skulu vera innan ásættanlegra marka sem fastsett eru fyrir prófunarlíkanið sem er notað (sjá 3. viðbæti).

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

36. Nota má ljósþéttnigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, til að reikna út lífvænleika í hundraðshlutum, staðlaðan við neikvæða samanburðinn sem er látinn gilda 100%. Ef litrófsmæling með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun er notuð er hundraðshlutfall lífvænleika reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans sem fæst með lifandi vef, sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika frumna, sem skilur á milli ertandi íðefna og óflokkaðra prófunaríðefna, og sú tölfræðilega aðferð eða aðferðir, sem eru notaðar til að meta niðurstöðurnar og greina ertandi íðefni, skulu skýrt skilgreind og skjalfest og sýna skal fram á að þau séu eins og við á (sjá staðlaðar verklagsreglur fyrir prófunarlíkönin, til upplýsingar). Þröskuldsgildi til að spá fyrir um ertandi áhrif eru gefin hér á eftir:

— Prófunaríðefnið reynist þurfa flokkun og merkingu í samræmi við HSK SÞ/reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun (1. eða 2. undirflokkur), ef meðalhundraðshlutfall lífvænleika vefjar eftir váhrif og ræktun að lokinni meðhöndlun er minna en eða jafnt (≤) 50%. Þar eð ekki er hægt að greina á milli 1. og 2. undirflokks HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun með prófunarlíkönunum með endurgerðri húðþekju manns, sem þessi prófunaraðferð nær yfir, er þörf á frekari upplýsingum um húðætingu til að ákvarða lokaflokkun [sjá einnig leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (3. heimild)]. Er prófunaríðefnið reynist óætandi (t.d. á grundvelli prófunaraðferðar 40, B.40a eða B.65) og sýnir lífvænleika vefjar eftir váhrif og ræktun eftir meðhöndlun sem er minni eða jafn (≤) 50%, er prófunaríðefnið talið húðertandi í samræmi við 2. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun.

— Háð reglurammanum í aðildarríkjum má líta svo á að prófunaríðefnið sé ekki ertandi fyrir húð, í samræmi við flokkun sem utan flokka í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, ef lífvænleiki vefjanna eftir váhrif og ræktun að lokinni meðhöndlun er meiri en (>) 50%.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

37. Setja skal gögn fyrir samhliða vefjasýni innan hverrar keyrslu (t.d. ljósþéttnigildi og gögn um reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir hvert prófunaríðefni, auk flokkunar) fram í töflu, þ.m.t. gögn úr endurteknum tilraunum, ef við á. Auk þess skal tilgreina meðaltal ± staðalfrávik fyrir hverja keyrslu. Vixlverkanir við MTT-hvarfmiðil og lituð prófunaríðefni skulu tilgreindar fyrir hvert prófað íðefni.

Prófunarskýrsla

38. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunar- og samanburðaríðefni:

— efni með einum efnisþætti: 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 blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,

— meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðaríðefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,

— geymsluskilyrði.

Líkan með endurgerðri húðþekju manns og aðferðarlýsing sem er notuð (og rökstuðningur fyrir valinu, ef við á)

Prófunarskilyrði:

— líkan með endurgerðri húðþekju manns sem er notað (þ.m.t. númer framleiðslulotu),

— kvörðunarupplýsingar um mælibúnaðinn (t.d. litrófsmælir), bylgjulengd og bandsía (ef við á) til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar; lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan,

— lýsing á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/úthá þrýstivökvaskiljun, ef við á, heildarupplýsingar til stuðnings notkunar á tilteknu líkani með endurgerðri húðþekju manns, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:

  i. lífvænleiki,

  ii. tálmavirkni,

  iii. formfræði,

  iv. samanburðarnákvæmni og forspárgeta,

  v. gæðaeftirlit með líkaninu,

— tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal felast, án þess þó að einskorðast við það, ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur.

— sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglulega notkun með því að prófa hæfnisefnin.

Prófunaraðferð:

— upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð (þ.m.t. skolunaraðferðir sem eru notaðar eftir váhrifatímabilið), skammtar prófunaríðefnis og samanburðaríðefnis sem eru notaðir,

— váhrifatími, hitastig við váhrif og stöðutími eftir váhrif,

— tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á,

— fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notuð fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og ósértæk afoxun MTT, $NSC_{lifandi}$ og $NSC_{dauður}$, ef við á),

— lýsing á ákvörðunarviðmiðunum/spálíkani sem er notað, á grundvelli líkansins með endurgerðri húðþekju manns sem er notað,

— lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni (þ.m.t. skolunaraðferðum).

Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir

— meðalgildi fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna, ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð,

— ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

Niðurstöður:

— töflusetning gagna fyrir stök prófunaríðefni fyrir hverja keyrslu og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljósþéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, hundraðshlutfall vefjalífvænleika, meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika og staðalfrávik,

— ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT og/eða prófunaríðefni til litunar, þ.m.t. ljósþéttni eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, $\%NSC_{lifandi}$, $\%NSC_{dauður}$, staðalfrávik og endanlegt rétt hundraðshlutfall lífvænleika vefjar,

— niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir,

— lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,

— afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Ályktanir

HEIMILDIR

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Aðgengilegt á: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/ Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.

5) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðætingu: Rafviðnám gegnum húð (TER).

6) Kafli B.40bis í þessum viðauka, Rannsókn *í glasi* á húðætingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns (RhE).

7) Kafli B.65 í þessum viðauka, Aðferð *í glasi* við prófun með tálma úr himnu.

8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Aðgengilegt á: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Ath.: Þetta eru upprunalegu nothæfisstaðlarnir sem voru notaðir við fullgildingu þessara tveggja prófunaraðferða. Ekki skal nota þessa nothæfisstaðla lengur því uppfærð útgáfa (8. heimild) er nú fáanleg.*

22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1,8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Handrit í vinnslu.

37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Aðgengilegt á: [http://www.fda.gov/downloads/ Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, í: Practical Contact Dermatitis, bls. 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Ath.: Þetta er gildandi útgáfa nothæfisstaðla Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða, uppfærð árið 2009 í ljósi innleiðingar HSK SÞ. Ekki skal nota þessa nothæfisstaðla lengur því uppfærð útgáfa (8. heimild) er nú fáanleg í tengslum við fyrirliggjandi viðmiðunarreglu um prófanir.*

40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, *Official Journal of the European Union* L225, 1-333.

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 (9. heimild).

Lífvænleiki frumna: Mæliþáttur sem mælir heildarvirkni frumuhóps, t.d. getu frumubundinna vetnissvipta í hvatberum til að draga úr líflitnum MTT (3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár) sem, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, samsvarar heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

Íðefni: efni eða blanda.

Samsvörun: Samsvörun er mælikvarði á nothæfi þegar um er að ræða prófunarlíkön sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (9. heimild).

ET_{50}: Hægt að meta með ákvörðun á þeim váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika frumu um 50% við notkun viðmiðunaríðefnis við tilgreindan, fastan styrk, sjá einnig IC_{50}.

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. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

HPLC: Háþrýstivökvaskiljun.

IATA: Samþættar aðferðir við prófun og mat.

IC_{50}: Hægt að meta með ákvörðun á þeim styrk viðmiðunaríðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC_{50}) eftir fastan váhrifatíma, sjá einnig ET_{50}.

Ótakmarkaður skammtur: Það magn prófunaríðefnis sem er borið á húðþekjuna og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð húðþekjunnar fullkomlega og jafnt.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

Efni með einum efnisþætti: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

MTT: 3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

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.

$NSC_{dauður}$: Samanburður fyrir ósértæka litun með dauðum vef.

$NSC_{lifandi}$: Samanburður fyrir ósértæka litun með lifandi vef.

NSMTT: Ósértæk afoxun MTT.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i) grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (9. heimild).

PC: 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.

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 (9. 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 (9. heimild).

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 (9. heimild).

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburði.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra prófunarefna 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 (9. heimild).

Húðerting *í lífi*: Framköllun á skemmd í húð sem getur gengið til baka og kemur fram eftir að prófunaríðefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir. Húðerting er staðbundin svörun viðkomandi húðvefjar sem kemur í ljós stuttu eftir örvun (38. heimild). Hún kemur til vegna staðbundinna bólguviðbragða í náttúrulegu (ósértæku) ónæmiskerfi húðvefjarins. Aðaleinkenni hennar er að hún gengur til baka, veldur bólguviðbrögðum og flestum klínískum einkennum ertingar (hörundsroða, bjúg, kláða og sársauka) sem tengjast bólguferli.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra prófunaríðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UPLC: Úthá þrýstivökvaskiljun.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

2. viðbætir

PRÓFUNARLÍKÖN SEM ÞESSI PRÓFUNARAÐFERÐ NÆR YFIR

Nr.	Heiti prófunarlíkans	Gerð fullgildingarrannsóknar	Tilvísanir
1	EpiSkin™	Víðtæk framskyggn fullgildingarrannsókn (2003–2007). Þættir þessa líkans voru notaðir til að skilgreina nauðsynlega prófunaraðferðarþætti í upprunalegum og uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (39., 40. og 21. heimild) (*). Auk þess voru gögnin úr aðferðinni varðandi greiningu óflokkaðra og flokkaðra efna helsti grundvöllurinn að skilgreiningu á gildum fyrir sértæki og næmi í upprunalegu nothæfisstöðlunum (*).	2., 10., 11., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 23., 32., 39. og 40. heimild
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*upprunalegt*): Upphaflega fór prófunarlíkanið í gegnum víðtæka framskyggna fullgildingu ásamt nr. 1 frá 2003–2007. Þættir þessa líkans voru notaðir til að skilgreina nauðsynlega prófunaraðferðaþætti í upprunalegum og uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (39., 40. og 21. heimild) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Breyting á upprunalegu EpiDerm™ var fullgilt með upprunalegum nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (21. heimild) árið 2008 (*).	2., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18., 20., 21., 23., 33., 39. og 40. heimild 2., 21., 22., 23., og 33. heimild
3	SkinEthic™ RHE	Fullgildingarrannsókn byggð á upprunalegum nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (21. heimild) árið 2008 (*).	2., 21., 22., 23., og 31. heimild
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Fullgildingarrannsókn (2011–2012) byggð á nothæfisstöðlum (PS) í OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (8. heimild) sem byggja á uppfærðum nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (*) (39. og 40. heimild).	24., 25., 26., 27., 28., 35., 39. og 40. heimild og not-hæfisstaðlar þessarar við-miðunarreglu um prófanir (8. heimild) (*)

(*) Upprunalegir nothæfisstaðlar Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (PS) (21. heimild) voruð þróaðir árið 2007 þegar framskyggnu fullgildingarrannsókninni (16. heimild) var lokið, þar sem árangur prófunarlíkananna nr. 1 og 2 var metinn að því er varðar flokkunarkerfið, eins og lýst er í 28. breytingu á tilskipun Evrópusambandsins um hættuleg efni (41. heimild). Árið 2008 komu til framkvæmda HSK SÞ (1. heimild) og reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun, þar sem þröskuldsgildi sem skilur á milli óflokkaðra og flokkaðra efna var fært í raun úr 2,0 stigum *í lífi* í 2,3 stig. Til að aðlagast breyttri kröfu samkvæmt reglum var skráin yfir nákvæmnisgildin og viðmiðunaríðefni í nothæfisstöðlum Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða uppfærð árið 2009 (2., 39. og 40. heimild). Líkt og upprunalegu nothæfisstaðlarnir voru uppfærðu nothæfisstaðlarnir að miklu leyti byggðir á gögnum frá líkönum nr. 1 og 2 (16. heimild) en til viðbótar voru notuð gögn um viðmiðunaríðefni frá líkani nr. 3. Árið 2010 voru uppfærðir nothæfisstaðlar Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða notaðir til að mæla fyrir um nothæfisstaðlana sem tengjast þessari viðmiðunarreglu um prófanir (8. heimild). Að því er varðar þessa prófunaraðferð telst EpiSkin™ fullgilta viðmiðunaraðferðin þar sem það var notað til að þróa allar viðmiðanir nothæfisstaðlanna. Ítarlegar upplýsingar um fullgildingarrannsóknir, samantekt á gögnum sem var aflað sem og bakgrunnsupplýsingar um nauðsynlegar breytingar á nothæfisstöðlunum í kjölfar framkvæmdar HSK SÞ/reglugerðar um flokkun, merkingu og pökkun má finna í bakgrunns- og skýringarskjali Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða/Stofnunar Sambandslýðveldisins Þýskalands fyrir áhættumat (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) samsvarandi OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir (23. heimild).

SIT: Prófun á húðertingu (e. *Skin Irritation Test*)

RHE: Endurgerð húðþekja manns (e. *Reconstructed Human Epidermis*)

3. viðbætir

MÆLIÞÆTTIR Í AÐFERÐARLÝSINGU SEM ERU SÉRTÆKIR FYRIR HVERT PRÓFUNARLÍKAN SEM ÞESSI PRÓFUNARAÐFERÐ NÆR YFIR

Líkönin með endurgerðri húðþekju manns eru með mjög svipaðar aðferðarlýsingar og einkum er í þeim öllum notað 42 klst. tímabil eftir stöðutíma (32.–35. heimild). Mismunurinn varðar aðallega þrjá mæliþætti í tengslum við mismunandi tálmavirkni prófunarlíkananna og er tilgreindur hér: A) tími og magn fyrir ræktun, B) prófunaríðefnin sett á og C) magn eftir ræktun

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Fyrir ræktun				
Ræktunartími	18–24 klst.	18–24 klst.	< 2 klst.	15–30 klst.
Magn ætis	2 ml	0,9 ml	0,3 eða 1 ml	0,5 ml
B) Prófunaríðefnið sett á				
Fyrir vökva	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Fyrir föst efni	10 mg (26 mg/cm^2) + EV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + EV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + EV (25µl)
Notkun nælonmöskva	Ekki notaður	Ef þörf krefur	Notaður	Ekki notaður
Heildarásetningartími	15 mínútur	60 mínútur	42 mínútur	15 mínútur
Ásetningarhitastig	SH	a) við SH í 25 mínútur b) við 37 °C í 35 mínútur	SH	SH
C) Magn eftir ræktun				
Magn ætis	2 ml	0,9ml x 2	2 ml	1 ml
D) Hámark ásættanlegs breytileika				
Staðalfrávik milli samhliða vefjasýna	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

SH: Stofuhiti
EV: eimað vatn
DPBS: Fosfatjöfnuð saltlausn Dulbecco

4. viðbætir

HELSTU MÆLIÞÆTTIR OG SAMÞYKKTARVIÐMIÐANIR FYRIR HÆFI LITRÓFSMÆLINGAKERFIS MEÐ HÁÞRÝSTI-/ÚTHÁÞRÝSTIVÖKVASKILJUN TIL MÆLINGAR Á MTT-FORMASANI SEM ER DREGIÐ ÚR VEF ENDURGERÐRAR HÚÐÞEKJU MANNS

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (36. og 37. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísi	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum vef endurgerðrar húðþekju manns án meðhöndlunar)	$Svæði_{truflun} \leq 20\%$ af $svæði_{LLOQ}$ (1)
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n=5)	FS ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	% frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=5)	85% ≤ áhrif efniviðarins ≤ 115%
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ (2)	$Svæði_{truflun} \leq 20\%$ af $svæði_{LLOQ}$
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrír óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanól í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml). Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=5)	Kvörðunarferlar: % frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3) 3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n=3)	Gæðaeftirlit: % frávika ≤ 15% og FS ≤ 15%
Skammtíma stöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika ≤ 15%
Langtímastöðugleiki MTT-formasans í útdrætti úr vef úr endurgerðri húðþekju manns, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við tiltekið hitastig (t.d. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	% frávika ≤ 15%“

(1) LLOQ: Neðri magngreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Efri magngreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærri en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við, þ.e. 200 µg/ml.

8) Í B-hluta er eftirfarandi köflum bætt við:

„B.63 SKIMUNARPRÓFUN FYRIR EITURHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 421 um prófanir (2016). OECD-viðmiðunarreglurnar um prófun íðefna eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda. Upprunaleg viðmiðunarregla 421 um skimunarprófanir var samþykkt 1995 á grundvelli aðferðarlýsingar fyrir „Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test“ (Bráðabirgðaskimunarprófun fyrir eiturhrif á æxlun) sem rædd var á tveimur fundum sérfræðinga í London 1990 (1. heimild) og í Tokyo 1992 (2. heimild).

2. Þessi prófunaraðferð hefur verið uppfærð með endapunktum sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni sem eftirfylgni vegna forgangsaðgerðarinnar sem Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur um prófanir og til að þróa nýjar viðmiðunarreglur um prófanir fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum (3. heimild). OECD-viðmiðunarregla 407 um prófanir (28 daga rannsókn á eiturhrifum hjá nagdýrum við endurtekna skammta um munn, kafli B.7 í þessum viðauka) var t.d. bætt árið 2008 með viðeigandi mæliþáttum til að greina virkni prófunaríðefna á innkirtla. Markmiðið með uppfærslunni á viðmiðunarreglu 421 um prófanir var að taka með nokkra endapunkta sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni í viðmiðunarreglunum um skimunarprófanir þar sem váhrifatímabilin ná yfir nokkur af viðkvæmu þroskunartímabilunum (tímabilin fyrir eða fyrst eftir got).

3. Völdu viðbættu endapunktarnir sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni, sem eru einnig í viðmiðunarreglu 443 um prófanir (Framlengd einnar kynslóðar rannsókn á eiturhrifum á æxlun, kafli B.56 í þessum viðauka), voru felldir inn í viðmiðunarreglu 421 um prófanir á grundvelli hagkvæmniathugunar þar sem fjallað var um vísindalegar og tæknilegar spurningar í tengslum við innfellingu þeirra sem og hugsanlegar breytingar sem þyrfti að gera á tilhögun prófunarinnar vegna innfellingar þeirra (4. heimild).

4. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að fá fram takmarkaðar upplýsingar varðandi áhrif prófunaríðefnis á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, pörunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got. Hún er hvorki annar valkostur né kemur í stað fyrirliggjandi prófunaraðferða B.31, B.34, B.35 eða B.56.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

5. Hægt er að nota þessa skimunarprófunaraðferð til að fá fyrstu upplýsingar um hugsanleg áhrif á æxlun og/eða þroskun, annaðhvort á fyrri stigum í mati á eiturefnafræðilegum eiginleikum íðefna eða á íðefnum sem gefa tilefni til áhyggna. Einnig er hægt að nota hana sem hluta af upphaflegum skimunarprófunum á fyrirliggjandi íðefnum þar sem litlar eða engar eiturefnafræðilegar upplýsingar eru tiltækar, sem skammtastærðarannsókn fyrir ítarlegri rannsóknir á æxlun/þroskun eða þegar það telst viðeigandi af öðrum ástæðum. Þegar rannsóknin er gerð skal fylgja þeim leiðbeinandi meginreglum og atriðum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 19 um kennsl, mat og notkun á klínískum einkennum sem mannúðlegum endapunktum fyrir tilraunadýr sem eru notuð við öryggismat (5. heimild).

6. Þessi prófunaraðferð veitir ekki tæmandi upplýsingar um alla þætti æxlunar og þroskunar. Einkum gefur hún einungis takmarkaða möguleika til að greina birtingarform sem tengjast váhrifum fyrir got, eftir gotið eða áhrif sem kunna að stafa af váhrifum eftir got. Vegna (m.a.) tiltölulega fárra dýra í skammtahópunum, sérvirkni endapunktanna og þess hversu stutt rannsóknin stendur yfir er ekki hægt að nota þessa aðferð til að sanna afdráttarlaust fullyrðingar um að engin áhrif komi fram. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum prófunum á eiturhrifum á æxlun/þroskun eru jákvæðar niðurstöður þar að auki gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra.

7. Niðurstöðurnar, sem fást með mæliþáttum sem tengjast innkirtlum, skal skoða í tengslum við „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum) (6. heimild). Í þessum hugtakaramma er bættri OECD-viðmiðunarreglu 421 um prófanir haldið á 4. þrepi eins og greiningu *í lífi* sem veitir upplýsingar um skaðleg áhrif á endapunkta í tengslum við innkirtla. Innkirtlaboð (e. *endocrine signal*) telst þó e.t.v. ekki nægileg sönnun ein og sér um að prófunaríðefnið sé innkirtlatruflandi efni.

8. Í þessari prófunaraðferð er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið sé gefið um munn. Það getur reynst nauðsynlegt að gera breytingar ef aðrar váhrifaleiðir eru notaðar.

9. 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.

10. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunaríðefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýr skulu fá skammta í a.m.k. fjórar vikur, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag (að lágmarki í tvær vikur fyrir pörun, á pörunartímabilinu og í u.þ.b. tvær vikur eftir pörun). Í ljósi þess hversu takmarkað skömmtunartímabilið er hjá karldýrum fyrir pörun er frjósemi e.t.v. ekki sérlega næmur mælikvarði á eiturhrif á eistu. Því er nauðsynlegt að framkvæma ítarlega, vefjafræðilega rannsókn á eistunum. Samsetning tveggja vikna skömmtunartímabils fyrir pörun og seinni athuganir á pörun/frjósemi ásamt heildarskömmtunartímabili sem er a.m.k. fjórar vikur, sem er fylgt eftir með ítarlegri vefjameinafræðilegri rannsókn á kynkirtlum karldýranna, telst fullnægjandi til að gera kleift að greina meirihluta áhrifa á frjósemi karldýra og sæðismyndun.

12. Kvendýr skulu fá skammta meðan á rannsókninni stendur. Þetta nær yfir tvær vikur fyrir pörun (með það að markmiði að ná yfir a.m.k. tvo heila gangferla), breytilegan tíma fram að getnaði, lengd meðgöngunnar og a.m.k. þrettán daga að loknu goti, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag.

13. Lengd rannsóknar eftir aðlögun og mat á gangferli fyrir skammtagjöf fer eftir háttalagi kvendýrsins og er u.þ.b. 63 dagar, [a.m.k. 14 dagar fyrir pörun, (allt að) 14 daga pörun, 22 daga meðgöngutími, 13 daga mjólkurskeið].

14. Dýrin eru skoðuð vandlega daglega á inngjafartímabilinu til að greina merki um eiturhrif. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófunartímabili stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Val á dýrategund

15. Þessi prófunaraðferð er ætluð til prófunar á rottum. Ef mæliþættirnir, sem tilgreindir eru í þessari prófunaraðferð, eru rannsakaðir í öðrum nagdýrum skal rökstyðja það ítarlega. Í alþjóðlegu fullgildingaráætluninni til að greina innkirtlatruflandi efni í OECD-viðmiðunarreglu 407 um prófanir (sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) var rottan eina tegundin sem var notuð. Ekki skal nota stofna ef frjósemi þeirra er lítil eða vitað er að þroskunargallar eru algengir. Nota skal heilbrigð dýr, sem hafa aldrei fengið fang, sem hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, kyn, þyngd og aldur tilraunadýranna. 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. Ef rannsóknin er gerð sem forrannsókn langtímarannsóknar eða rannsóknar á heilli kynslóð er ákjósanlegt að dýr af sama stofni og uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

Aðbúnaður og fóðrun

16. Öll verkferli skulu vera í samræmi við staðbundna staðla um umönnun tilraunadýra. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 ºC (± 3 °C). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og ljóslotan skal vera 12 klukkustundir af birtu 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.

17. Dýrin skulu vera í búri með litlum hópum af sama kyni en þau má hafa hvert í sínu búri ef færð eru vísindaleg rök fyrir því. Þegar dýr eru saman í búri skulu þau ekki vera fleiri en fimm í hverju búri. Pörun skal fara fram í búrum sem eru til þess hentug. Koma skal kvendýrum með fangi hverju fyrir sig í búr og láta þau fá efni til að gera sér bæli. Mjólkandi kvendýrum er komið hverju fyrir sig í búr ásamt afkvæmum þeirra.

18. Greina skal fóðrið reglulega með tilliti til aðskotaefna. Halda skal til haga sýni úr fæðunni þar til skýrslan er tilbúin.

Undirbúningur dýranna

19. Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og tilraunahópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

Tilreiðsla skammta

20. Mælt er með því að prófunaríðefnið sé gefið um munn nema aðrar íkomuleiðir séu taldar heppilegri. Þegar inngjöf um munn er valin er prófunaríðefnið yfirleitt gefið með magafóðrun; þó má að öðrum kosti gefa prófunaríðefni inn með fóðri eða drykkjarvatni.

21. Ef nauðsyn krefur er prófunaríðefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/ýrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða skal stöðugleika og einsleitni prófunaríðefnisins í burðarefninu.

VERKFERLI

Fjöldi og kyn dýra

22. Mælt er með því að hver hópur innihaldi í upphafi a.m.k 10 karldýr og 12–13 kvendýr. Gangferill kvendýranna er metinn fyrir váhrif og þau dýr sem sýna ekki hefðbundinn 4–5 daga gangferil skulu ekki höfð með í rannsókninni; því er mælt með því að hafa aukakvendýr til að ná upp í 10 kvendýr í hvern hóp. Búist er við að þetta gefi a.m.k. 8 kvendýr með fangi í hverjum hóp, sem er venjulega sá lágmarksfjöldi sem telst viðunandi af kvendýrum með fangi í hverjum hóp, nema ef um er að ræða greinileg eiturhrif. Markmiðið er að fá fram nægilega margar þunganir og afkvæmi til að marktækt mat fáist á mætti prófunaríðefnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu, atferli mæðra og mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F1-afkvæmanna frá getnaði fram að 13. degi eftir got.

Skammtur

23. Almennt skal nota a.m.k. þrjá prófunarhópa og samanburðarhóp. Skammtastærðir geta verið byggðar á upplýsingum úr prófunum á bráðum eiturhrifum eða á niðurstöðum úr rannsóknum með endurteknum skömmtum. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunaríðefnið. Ef burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal samanburðarhópurinn fá stærsta skammt sem er notaður af burðarefninu.

24. Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturhrif og eiturefnahvörf. Einnig skal taka tillit til þess að það kann að vera munur á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Stærsta skammtastærðin skal valin með það fyrir augum að hún valdi eiturhrifum en ekki dauða eða miklum þjáningum. Eftir það skal velja röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10).

25. Ef almennra eiturhrifa verður vart (t.d. minni líkamsþyngd, áhrif á lifur, hjarta, lungu eða nýru o.s.frv.) eða annarra breytinga sem eru e.t.v. ekki eiturefnasvörun (t.d. minna fóðurát, stækkun lifur), skulu þau áhrif sem verður vart á næma endapunkta innkirtla túlkuð með fyrirvara.

Markprófun

26. Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri eða drykkjarvatni, þar sem notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, framkallar engin merkjanleg eiturhrif og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með skylda efnabyggingu kann fullnaðarrannsókn með mörgum skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að gefa þurfi stærri skammt um munn. Þegar ákomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, ákvarðast sá hámarksstyrkur sem hægt er að ná oft af eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnanna.

Gjöf skammta

27. Dýrunum er gefið prófunaríðefnið daglega, sjö daga vikunnar. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið skal ekki vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi prófunaríðefni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

28. Þegar um er að ræða prófunaríðefni sem er gefið inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunaríðefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Þegar prófunaríðefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð, miðað við líkamsþyngd dýranna og skal taka það fram hvor leiðin er farin. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega svo að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins.

Tilraunaáætlun

29. Skömmtun hjá báðum kynjum skal hefjast a.m.k. tveimur vikum fyrir pörun eftir að þau hafa verið látin aðlagast aðstæðum í a.m.k fimm daga og kvendýrin hafa verið skimuð fyrir eðlilegum gangferlum (á tveggja vikna formeðferðartímabili). Rannsóknin skal skipulögð þannig að mat á gangferli hefjist fljótlega eftir að dýrin hafa náð fullum kynþroska. Þetta getur verið aðeins breytilegt milli mismunandi rottustofna á mismunandi rannsóknarstofum, t.d. hjá rottum af stofninum Sprague Dawley þegar þær eru 10 vikna gamlar og hjá rottum af stofninum Wistar þegar þær eru u.þ.b. 12 vikna gamlar. Mæður með afkvæmi skal aflífa á 13. degi eftir got eða stuttu síðar. Gotdagurinn (þ.e. þegar goti er lokið) er skilgreindur sem dagur 0 eftir got. Kvendýr sem sýna engin merki um mökun eru aflífuð 24–26 dögum eftir síðasta dag pörunartímabilsins. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á pörunartímabilinu. Karldýr skulu áfram fá skammta eftir pörunartímabilið a.m.k. þar til að lágmarki 28 daga heildarskömmtunartímabili hefur verið náð. Þau eru síðan aflífuð eða, að öðrum kosti, skömmtun er haldið áfram fyrir hugsanlega pörun í annað skipti ef ástæða þykir til.

30. Kvendýr af foreldrakynslóðinni skulu áfram fá daglega skammta meðan á meðgöngu stendur og a.m.k. fram að 13. degi eftir got og að honum meðtöldum eða þangað til daginn fyrir aflífun. Að því er varðar rannsóknir þar sem prófunaríðefnið er gefið við innöndun eða með ákomuleið um húð skal halda skömmtun áfram a.m.k. fram að 19. degi meðgöngu og að honum meðtöldum og hefja skal skömmtun aftur eins fljótt og auðið er og ekki síðar en á 4. degi eftir got.

31. Skýringarmynd af tilraunaáætluninni er að finna í 2. viðbæti.

Pörunaraðferð

32. Að jafnaði skal nota 1:1 pörun (eitt karldýr fyrir hvert kvendýr) í þessari rannsókn. Frávik geta komið upp ef um er að ræða að karldýr drepast. Kvendýrið skal haft hjá sama karldýrinu þar til vísbendinga um mökun verður vart eða tvær vikur eru liðnar. Á hverjum morgni er leitað að sæði eða leggangatappa í kvendýrunum. Dagurinn þegar staðfestar vísbendingar eru um pörun (leggangatappi eða sæði finnst) telst vera dagur 0 á meðgöngu. Ef pörun mistekst má reyna að para kvendýrið saman við karldýr úr sama hópnum sem hefur reynst frjótt.

Stærð gots

33. Á 4. degi eftir got má aðlaga stærð hvers gots með því að fjarlægja aukaunga með slembivali til að eftir verði, eins nálægt því og mögulegt er, fjórir eða fimm ungar af hvoru kyni í hverju goti með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður. Taka skal blóðsýni úr tveimur umframungum, hópa þau og nota til að ákvarða magn T4 í sermi. Valvís fjarlæging unga, t.d. á grundvelli líkamsþyngdar eða bils milli endaþarmsops og ytri kynfæra, er ekki viðeigandi. Þegar fjöldi karlkyns eða kvenkyns unga gefur ekki kost á fjórum eða fimm af hvoru kyni í hverjum goti má nota ófullkomna aðlögun (t.d. sex karldýr og fjögur kvendýr). Engir ungar skulu fjarlægðir þegar gotstærðin fer undir aflífunarviðmiðið (8 eða 10 ungar/got). Ef einungis er einn ungi umfram aflífunarviðmiðið skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

34. Ef gotstærð er ekki aðlöguð eru tveir ungar úr hverju goti aflífaðir á 4. degi eftir got og blóðsýni tekin til að mæla styrkleika skjaldkirtilshormóna í sermi. Ef hægt er skulu ungarnir tveir úr hverju goti vera kvendýr, til að geyma karlkynsungana fyrir mat á geymd geirvörtu, nema fjarlæging þessara unga verði til þess að engin kvendýr verði eftir fyrir mat við lok prófunarinnar. Ekki skal fjarlægja unga þegar gotstærð er undir 8 eða 10 ungar/got (með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður). Ef einungis er einn ungi umfram venjulega gotstærð skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

Athuganir í lífi

Klínískar athuganir

35. Almennar klínískar athuganir skulu gerðar a.m.k. einu sinni á dag allt prófunartímabilið og oftar ef merki hafa fundist um eiturhrif. Helst á að gera þær á sama tíma/sömu tímum á hverjum degi að teknu tilliti til þess hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Skrá skal breytingar á atferli sem máli skipta, merki um erfitt eða langvarandi got og öll merki um eiturhrif, að dauða meðtöldum. Þessar skráningar skulu innihalda upplýsingar um merki um eiturhrif, hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara.

Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja

36. Karl- og kvendýr skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtunar, a.m.k. vikulega eftir það og við lok prófunar. Kvendýr skulu vigtuð á meðgöngunni á degi 0, á 7., 14. og 20. degi og innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Þessar athuganir skal skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig.

37. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu fyrir pörun, á meðgöngu og á mjólkurskeiði. Mælingar á fóðuráti á pörunartímabilinu eru valkvæðar. Einnig skal mæla vatnsdrykkju á þessum tímabilum þegar prófunaríðefnið er gefið inn með drykkjarvatni.

Gangferlar

38. Vakta skal gangferla áður en meðferð hefst til að velja kvendýr með reglulega gangferla fyrir rannsóknina (sjá 22. lið). Strok úr leggöngum skal einnig vakta daglega frá upphafi meðferðartímabilsins þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Ef áhyggjur vakna af bráðum streituáhrifum, sem gætu breytt gangferlum, við upphaf skömmtunar geta rannsóknarstofur látið tilraunadýrin verða fyrir váhrifum í tvær vikur og síðan safnað stroki úr leggöngum daglega til að vakta gangferil í a.m.k. tvær vikur á tímabilinu fyrir pörun og haldið vöktun áfram á pörunartímabilinu þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (7.–8. heimild).

Mæliþættir sem varða afkvæmi

39. Lengd meðgöngutíma skal skráð og hún er reiknuð frá degi 0 á meðgöngu. Rannsaka skal hvert got eins fljótt og hægt er að loknu goti til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra unga, fjölda lifandi unga, ófullburða unga (unga sem eru talsvert minni en samsvarandi samanburðarungar) og stórsæjan afbrigðileika.

40. Lifandi ungar skulu taldir og kyn þeirra ákvarðað og gotið skal vigtað innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Auk athugananna sem er lýst í 35. lið skal skrá allt óeðlilegt atferli afkvæmanna.

41. Mæla skal bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra hvers unga á sama degi eftir got, á bilinu frá degi 0 eftir got fram til loka 4. dags eftir got. Mæla skal líkamsþyngd unganna sama dag og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra skal staðlað miðað við mælieiningu fyrir stærð unga, helst þriðju rót af líkamsþyngd (9. heimild). Telja skal fjölda geirvartna/vörtubauga hjá karlkynsungum á 12. eða 13. degi eftir got, eins og mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 151 (10. heimild).

Klínísk lífefnafræði

42. Blóðsýni eru tekin úr skilgreindum stað á grundvelli eftirfarandi áætlunar:

— úr a.m.k. tveimur ungum í hverju goti á 4. degi eftir got ef fjöldi unga gerir það kleift (sjá 33.–34. lið)

— úr öllum mæðrum og a.m.k. tveimur ungum í hverju goti við lok prófunarinnar á 13. degi, og

— úr öllum fullvöxnum karldýrum við lok prófunarinnar.

Öll blóðsýni eru geymd við viðeigandi skilyrði. Blóðsýni úr ungum á 13. degi og fullvöxnum karldýrum eru metin m.t.t. styrkleika skjaldkirtilshormóna (T4) í sermi. Framkvæma skal frekara mat á T4 í blóðsýnum úr mæðrum og ungum á 4. degi, ef við á. Annar valkostur er að mæla önnur hormón, ef við á. Hægt er að hópa blóð úr ungum eftir goti til greiningar á skjaldkirtilshormónum. Skjaldkirtilshormóna (T4 og TSH) skal helst mæla sem eitt heildargildi.

43. Eftirfarandi þættir geta haft áhrif á breytileika og hreinan styrk við ákvörðun á hormónum:

— aflífunartími vegna daglegs breytileika í hormónastyrkleikum

— aðferð við aflífun til að koma í veg fyrir óþarfa álag á dýrin sem gæti haft áhrif á hormónastyrkleika

— prófunarsett fyrir ákvarðanir á hormónum sem geta haft mismunandi staðalferla.

44. Blóðvökvasýni, sem eru sérstaklega ætluð til ákvörðunar á hormónum, skal taka á svipuðum tíma dags. Tölugildin sem fást þegar hormónastyrkleikar eru greindir eru breytileg eftir því hver hinna ýmsu greiningarsetta á markaði eru notuð.

Meinafræði

Stórsæ krufning

45. Skoða skal fullvöxnu dýrin með berum augum eftir aflífun eða ef dýrin drepast í rannsókninni til að leita að afbrigðileika eða sjúklegum breytingum. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum. Skrá skal fjölda tilvika hreiðrunar. Að morgni krufningardags skal skoða strok úr leggöngum til að ákvarða hvar dýrin eru stödd í gangferlinum og til að ná fram samsvörun við vefjameinafræðilega rannsókn á eggjastokkum.

46. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá eistum og eistalyppum, sem og blöðruhálskirtli og sáðblöðrum með hlaupkirtlum í heild sinni, allra fullvaxinna karldýra, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Að auki er valkvætt að vigta fleiri líffæri s.s. lyftivöðva endaþarms og klumbu- og vattarvöðvann, klumbukirtla og reðurhúfu karldýra og eggjastokka (blautvigt) og leg (þ.m.t. legháls) kvendýra; ef þessar vigtanir eru hafðar með skulu þær framkvæmdar eins fljótt og hægt er eftir krufningu.

47. Dauða unga og unga sem eru aflífaðir á 13. degi eftir got eða stuttu síðar skal a.m.k. skoða vandlega m.t.t. stórsærra afbrigðileika. Gefa skal sérstakan gaum að ytri æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávik frá eðlilegri þroskun. Á 13. degi skal varðveita skjaldkirtillinn úr 1 karlkynsunga og 1 kvenkynsunga í hverju goti.

48. Varðveita skal eggjastokka, eistu, aukalíffæri kynkerfis (leg og legháls, eistalyppu, blöðruhálskirtil, sáðblöðru með hlaupkirtlum), skjaldkirtil og öll líffæri, sem sýna stórsæjar vefjaskemmdir, úr öllum fullvöxnum dýrum. Ekki er mælt með formalíni sem festingu fyrir venjubundna rannsókn á eistum og eistalyppum. Notkun á Bouin-festiefni eða breyttu Davidsons-festiefni fyrir þessa vefi er ásættanleg aðferð (11. heimild). Gata má hvíthjúpinn varlega og grunnt með nál á báðum endum líffærisins til að auðvelda gegnumflæði festiefnisins.

Vefjameinafræðileg rannsókn

49. Framkvæma skal ítarlega vefjafræðilega rannsókn á eggjastokkum, eistum og eistalyppum (þar sem sérstök áhersla er lögð á stig sæðismyndunar og vefjameinafræðilega rannsókn á byggingu millifruma í eistum) dýranna í hópnum sem fékk stærsta skammtinn og samanburðarhópnum. Önnur varðveitt líffæri þ.m.t. skjaldkirtill úr ungum og fullvöxnum dýrum, má rannsaka þegar þörf krefur. Þyngd skjaldkirtils er hægt að mæla eftir festingu. Einnig skal skorið frá með mikilli varúð og eingöngu eftir festingu til að koma í veg fyrir vefjaskemmdir. Vefjaskemmdir geta spillt vefjameinafræðilegri greiningu. Rannsóknirnar skulu einnig ná til dýra úr öðrum skammtahópum ef breytingar finnast í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Í leiðbeiningum um vefjameinafræði (11. heimild) er að finna fleiri upplýsingar um krufningu, festingu, sneiðingu og vefjameinafræðilega rannsókn á innkirtlavefjum.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

50. Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Að auki skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi frjórra dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta. Snið yfirlitsskýrslu í töfluformi, sem hefur reynst mjög gagnleg við mat á áhrifum á æxlun/þroskun, er að finna í 3. viðbæti.

51. Vegna takmarkaðs umfangs rannsóknarinnar hafa tölfræðilegar greiningar í formi prófana m.t.t. „marktækni“ takmarkað gildi að því er varðar marga endapunkta, einkum æxlunarendapunkta. Ef tölfræðilegar greiningar eru notaðar skal aðferðin, sem valin er, hæfa dreifingu breytanna sem rannsakaðar eru og hún skal valin áður en rannsóknin hefst. Tölfræðileg greining á bili milli endaþarmsops og ytri kynfæra og á geymd geirvörtu skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til áhrifa frá goti. Eftir því sem við á er gotið greiningareiningin. Tölfræðileg greining á líkamsþyngd unga skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til stærðar gotsins. Sökum þess að hópurinn er lítill getur notkun á sögulegum samanburðargögnum (t.d. fyrir stærð gots), ef þau liggja fyrir, einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.

Mat á niðurstöðum

52. Meta skal niðurstöðurnar úr þessari rannsókn á eiturhrifum með tilliti til þeirra áhrifa sem verður vart, niðurstaðna úr krufningum og smásjárrannsóknum. Matið skal ná til tengsla milli skammtsins af prófunaríðefninu annars vegar og þess hvort frávik koma fram eða ekki og tíðni og alvarleika afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, ófrjósemi, klínísk frávik, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturhrif.

53. Sökum þess að meðferðartímabil karldýranna er stutt skal skoða vefjameinafræðilega rannsókn á eistum og eistalyppum ásamt frjósemisgögnunum þegar áhrif á æxlun karldýra eru metin. Notkun rannsóknarsögulegra samanburðargagna um æxlun/þróun (t.d. um stærð gots, bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra, geymd geirvörtu, magn T4 í sermi), ef þau liggja fyrir, getur einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.

54. Að því er varðar gæðaeftirlit er mælt með því að rannsóknarsögulegum samanburðargögnum verði safnað saman og að frávikssstuðull verði reiknaður út fyrir töluleg gögn, einkum fyrir mæliþættina sem tengjast greiningu á innkirtlatruflandi efnum. Þessi gögn má nota til samanburðar þegar raunverulegar rannsóknir eru metnar.

Prófunarskýrsla

55. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

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.

Burðarefni (ef við á):

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

Tilraunadýr:

— tegund eða stofn sem er notaður,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunarinnar,

— rökstuðningur fyrir öðrum tegundum en rottum.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um samsetningu prófunaríðefnisins eða blöndun þess í fóður, styrk sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— umreikningur á styrk prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— nákvæm lýsing á verklagi við slembiröðun við val á ungum sem skal aflífa, ef aflífun fer fram.

Niðurstöður:

— líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,

— fóðurát og vatnsdrykkja, ef það liggur fyrir,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. frjósemi, meðganga og öll önnur merki um eiturhrif,

— lengd meðgöngu,

— eiturhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir got o.s.frv.,

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— fjöldi fullvaxinna kvendýra með eðlilegan eða afbrigðilegan gangferil og gangferilslengd,

— fjöldi lifandi fæddra unga og fósturláta eftir hreiðrun,

— upplýsingar um líkamsþyngd unga,

— bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra allra unga (og líkamsþyngd sama dag og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt),

— geymd geirvörtu hjá karlkynsungum,

— skjaldkirtilshormónagildi, ungar á 13. degi og fullvaxin karldýr (og mæður og ungar á 4. degi, ef mæld),

— fjöldi unga með stórsæjan afbrigðileika, almennt mat á ytri kynfærum, fjöldi ófullburða afkvæma,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— fjöldi hreiðrana, gotstærð og þyngd gots á skráningartímanum,

— líkamsþyngd við aflífun og gögn um þyngd líffæra úr dýrum af foreldrakynslóð,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Ályktanir.

Túlkun niðurstaðna

56. Í þessari rannsókn eru eiturhrif á æxlun/þroskun metin í tengslum við endurtekna skammtagjöf (sjá 5. og 6. lið). Hún getur gefið vísbendingar um nauðsyn þess að gera frekari rannsóknir og veitir leiðbeiningar um útfærslu á síðari rannsóknum. Styðjast skal við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 43 við túlkun niðurstaðna úr rannsóknum á æxlun og þroskun (12. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 106 um vefjafræðilegt mat prófana á innkirtlum og æxlun nagdýra) (11. heimild) eru veittar upplýsingar um undirbúning og mat á (innkirtlum) líffærum og stroki úr leggöngum sem getur verið gagnlegt fyrir þessa viðmiðunarreglu.

HEIMILDIR

1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

1. viðbætir.

SKILGREININGAR (SJÁ EINNIG LEIÐBEININGARSKJAL EFNAHAGS- OG FRAMFARASTOFNUNARINNAR NR. 150 (6. HEIMILD))

Andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt andrógenhormón (t.d. testósterón) í spendýri.

(and)andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs andrógenhormóns (t.d. testósteróns) í spendýri.

(and)estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs estrógenhormóns (t.d. estradíóls 17ß) í spendýri.

(and)skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs skjaldkirtilshormóns (t.d. T3) í spendýri.

Íðefni: efni eða blanda.

Eiturhrif á þroskun: birtingarform eiturhrifa á æxlun í formi gerðarrasks (e. *structural disorder*) eða starfsemistruflunar hjá afkvæmunum fyrir fæðingu, í fæðingu eða eftir fæðingu.

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Skammtur: það magn prófunaríðefnis sem er gefið. Skammturinn er gefinn upp sem þyngd prófunaríðefnis á hverja líkamsþyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg líkamsþyngdar á dag) eða sem stöðugur styrkur í fóðri.

Augljós eiturhrif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturhrif í kjölfar þess að prófunaríðefni er gefið. Þau ættu að nægja fyrir hættumat og vera þess eðlis að búast megi við að aukning á gefnum skammti leiði til þess að merki um alvarlega eitrun komi fram og leiði líklega til dauða.

Skerðing á frjósemi: röskun á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- eða kvendýra.

Eiturhrif á móður: skaðleg áhrif á kvendýr með fangi sem eiga sér stað annað hvort á sértækan hátt (bein áhrif) eða ósértækan hátt (óbein áhrif).

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“. Þetta er stærsta skammtastærðin sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum vegna meðferðarinnar.

Estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt estrógenhormón (t.d. estradíól 17ß) í spendýri.

Eiturhrif á æxlun: skaðleg áhrif á afkvæmi og/eða skerðing á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- og kvendýra.

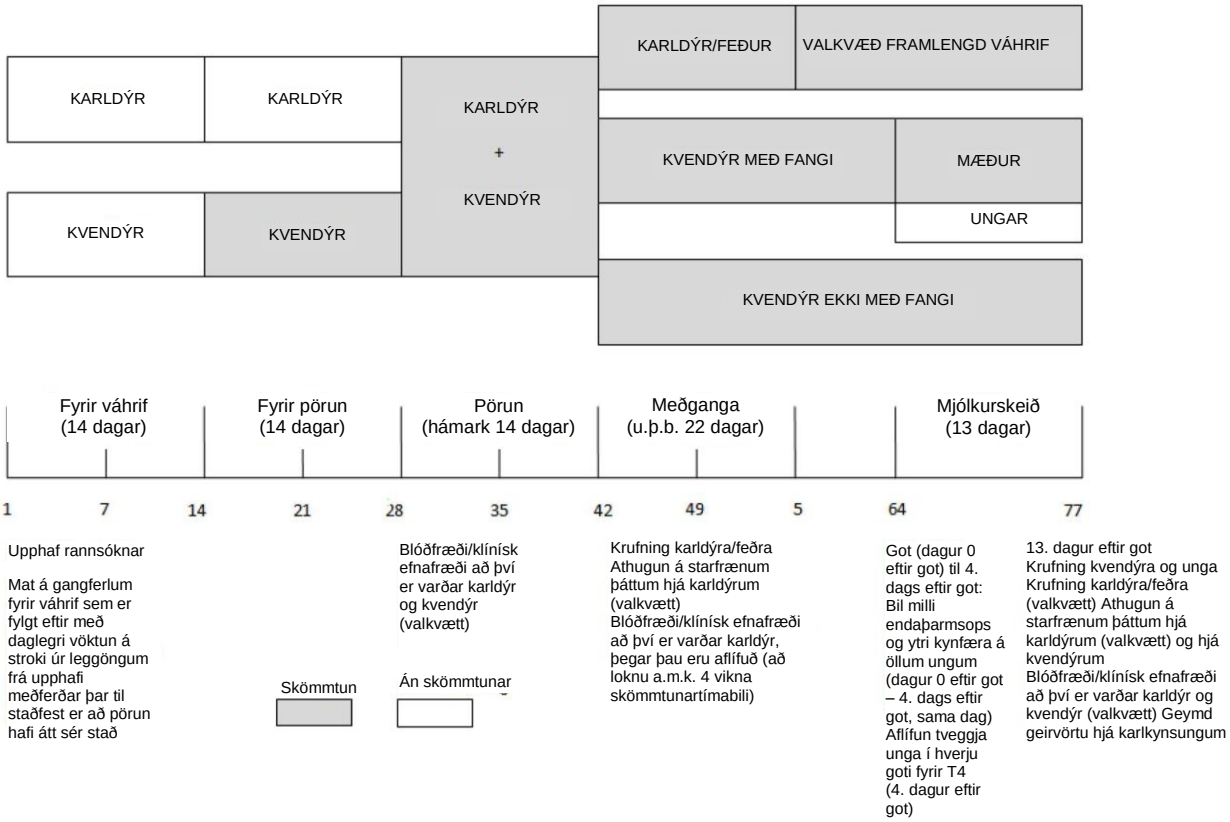
Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt skjaldkirtilshormón (t.d. T3) í spendýri.

Fullgilding: vísindalegt ferli hannað til að lýsa rekstrarlegum kröfum og takmörkunum prófunaraðferðar og til að sýna fram á áreiðanleika og vægi í tilteknum tilgangi.

2. viðbætir.

SKÝRINGARMYND AF TILRAUNAÁÆTLUN SEM SÝNIR HÁMARKSLENGD RANNSÓKNAR, BYGGT Á HEILU 14 DAGA PÖRUNARTÍMABILI



3. viðbætir.

YFIRLITSSKÝRSLA Í TÖFLUFORMI UM ÁHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

ATHUGANIR	GILDI				
Skammtur (einingar)	0 (saman-burðarsýni)	…	…	…	…
Dýr sett saman í pör (N)					
Gangferill (a.m.k. meðallengd og tíðni óreglulegra ferla)					
Kvendýr sem sýna merki um mökun (N)					
Kvendýr sem hafa fest fang (N)					
Getnaður, dagar 1–5 (N)					
Getnaður, dagar 6–... ([1]) (N)					
Meðganga ≤ 21 dagur (N)					
Meðganga = 22 dagar (N)					
Meðganga ≥ 23 dagar (N)					
Mæður með lifandi nýfædda unga (N)					
Mæður með lifandi unga á 4. degi eftir got (N)					
Fang/móðir (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður við got (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður á 4. degi (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) við got (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) á 4. degi (meðaltal)					
Gotsþyngd við got (meðaltal)					
Gotsþyngd á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga við got (meðaltal)					
Þyngd unga þegar bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra)					

ATHUGANIR	GILDI				
Skammtur (einingar)	0 (saman-burðarsýni)	…	…	…	…
Bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra unga á sama degi eftir got, frá gotdegi – 4. dags (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra, athugasemdir á sama degi eftir got)					
Þyngd unga á 4. degi (meðaltal)					
Geymd geirvörtu hjá karlkynsungum á 13. degi (meðaltal)					
Þyngd unga á 13. degi (meðaltal)					
AFBRIGÐILEGIR UNGAR					
Mæður með 0					
Mæður með 1					
Mæður með 2					
TAP AFKVÆMA					
Fyrir got/eftir hreiðrun (hreiðrun mínus lifandi fæddir ungar)					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með 3					
Eftir got (lifandi fæddir ungar mínus lifandi á 13. degi eftir got)					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með 3					

([1]) síðasti dagur pörunartímabilsins

B.64 SAMEINUÐ RANNSÓKN Á EITURHRIFUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA OG SKIMUNARPRÓFUN FYRIR EITURHRIFUM Á ÆXLUN/ÞROSKUN

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 422 um prófanir (2016). OECD-viðmiðunarreglurnar um prófun íðefna eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda. Upprunaleg viðmiðunarregla 422 um skimunarprófanir var samþykkt 1996 á grundvelli aðferðarlýsingar fyrir „Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test“ (Sameinuð skimunarprófun við endurtekna skammta og eiturhrif á æxlun/þroskun) sem rædd var á tveimur fundum sérfræðinga í London 1990 (1. heimild) og í Tokyo 1992 (2. heimild).

2. Þessi prófunaraðferð sameinar hlutann um skimun fyrir eiturhrifum á æxlun/þroskun, sem byggir á fenginni reynslu í aðildarríkjunum af notkun upprunalegu aðferðarinnar fyrir fyrirliggjandi stórframleiðsluíðefni og í rannsóknarprófunum með jákvæðum samanburðarefnum (3. og 4. heimild), og hlutann um eiturhrif við endurtekna skammta í samræmi við OECD-viðmiðunarreglu 407 um prófanir (28 daga rannsókn á eiturhrifum hjá nagdýrum við endurtekna skammta um munn, kafli B.7 í þessum viðauka).

3. Þessi prófunaraðferð hefur verið uppfærð með endapunktum sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni sem eftirfylgni vegna forgangsaðgerðarinnar sem Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur um prófanir og til að þróa nýjar viðmiðunarreglur um prófanir fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum (5. heimild). Í þessu samhengi var viðmiðunarregla 407 (sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) bætt árið 2008 með viðeigandi mæliþáttum til að greina virkni prófunaríðefna á innkirtla. Markmiðið með uppfærslunni á viðmiðunarreglu 422 um prófanir var að taka með nokkra endapunkta sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni í viðmiðunarreglunum um skimunarprófanir þar sem váhrifatímabilin ná yfir nokkur af viðkvæmu þroskunartímabilunum (tímabilin fyrir eða fyrst eftir got).

4. Völdu viðbættu endapunktarnir sem skipta máli fyrir innkirtlatruflandi efni, sem eru einnig í viðmiðunarreglu 443 um prófanir (Framlengd einnar kynslóðar rannsókn á eiturhrifum á æxlun sem samsvarar kafla B.56 í þessum viðauka), voru felldir inn í viðmiðunarreglu 422 um prófanir á grundvelli hagkvæmniathugunar þar sem fjallað var um vísindalegar og tæknilegar spurningar í tengslum við innfellingu þeirra sem og hugsanlegar breytingar sem þyrfti að gera á tilhögun prófunarinnar vegna innfellingar þeirra (6. heimild).

5. Þessi prófunaraðferð er ætluð til að fá fram takmarkaðar upplýsingar varðandi áhrif prófunaríðefnis á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, pörunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got. Hún er hvorki annar valkostur né kemur í stað fyrirliggjandi prófunaraðferða B.31, B.34, B.35 eða B.56.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

6. Við mat á eitureiginleikum prófunaríðefnis má ákvarða eiturhrif um munn með inngjöf endurtekinna skammta eftir að fyrstu upplýsinga um eiturhrif hefur verið aflað með prófunum á bráðum eiturhrifum. Með þessari rannsókn fást upplýsingar um hugsanlegar heilbrigðishættur vegna endurtekinna váhrifa í tiltölulega takmarkaðan tíma. Aðferðin felst í grunnrannsókn á eiturhrifum við endurtekna skammta sem hægt er að nota fyrir íðefni þar sem ekki er tilefni til að nota 90 daga rannsókn (t.d. þegar framleiðslumagnið fer ekki yfir tiltekin mörk) eða sem forrannsókn langtímarannsóknar. Þegar rannsóknin er gerð skal fylgja þeim leiðbeinandi meginreglum og atriðum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 19 um kennsl, mat og notkun á klínískum einkennum sem mannúðlegum endapunktum fyrir tilraunadýr sem eru notuð við öryggismat (7. heimild).

7. Hún felur enn fremur í sér skimunarprófun fyrir eiturhrifum á æxlun/þroskun og er því hægt að nota hana til að fá fyrstu upplýsingar um hugsanleg áhrif á tímgunargetu karl- og kvendýra s.s. kynkirtlastarfsemi, mökunarhegðun, getnað, þroskun fangs og got, annaðhvort á fyrri stigum í mati á eiturefnafræðilegum eiginleikum íðefna eða á íðefnum sem gefa tilefni til áhyggna. Þessi prófunaraðferð veitir ekki tæmandi upplýsingar um alla þætti æxlunar og þroskunar. Einkum gefur hún einungis takmarkaða möguleika til að greina birtingarform sem tengjast váhrifum fyrir got, eftir gotið eða áhrif sem kunna að stafa af váhrifum eftir got. Vegna (m.a.) sérvirkni endapunktanna og þess hversu stutt rannsóknin stendur yfir er ekki hægt að nota þessa aðferð til að sanna afdráttarlaust fullyrðingar um að engin áhrif komi fram á æxlun/þroskun. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum prófunum á eiturhrifum á æxlun/þroskun eru jákvæðar niðurstöður þar að auki gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra.

8. Niðurstöðurnar, sem fást með mæliþáttum sem tengjast innkirtlum, skal skoða í tengslum við „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum) (8. heimild). Í þessum hugtakaramma er bættri OECD-viðmiðunarreglu 422 um prófanir haldið á 4. þrepi eins og greiningu *í lífi* sem veitir upplýsingar um skaðleg áhrif á endapunkta í tengslum við innkirtla Innkirtlaboð (e. *endocrine signal*) telst þó e.t.v. ekki nægileg sönnun ein og sér um að prófunaríðefnið sé innkirtlatruflandi efni.

9. Í þessari prófunaraðferð er einnig lögð áhersla á taugafræðileg áhrif sem sérstakan endapunkt og áhersla er lögð á vandlegar klínískar athuganir á dýrunum til að fá fram eins miklar upplýsingar og unnt er. Aðferðin miðar að því að sanngreina íðefni sem geta valdið taugaeiturhrifum og slíkt getur gefið tilefni til meiri og ítarlegri rannsókna. Að auki getur aðferðin einnig veitt grunnábendingar um áhrif á ónæmiskerfið.

10. Ef ekki liggja fyrir gögn úr öðrum rannsóknum á altækum eiturhrifum, eiturhrifum á æxlun/þroskun, taugaeiturhrifum og/eða ónæmiseiturhrifum eru jákvæðar niðurstöður gagnlegar fyrir fyrsta hættumat og til að taka ákvarðanir að því er varðar nauðsyn þess að framkvæma viðbótarprófanir og um tímasetningu þeirra. Prófunin getur einkum verið gagnleg sem hluti af „OECD Screening Information Data Set“ (SIDS) (upplýsingagagnasafn OECD vegna skimunar) til að meta fyrirliggjandi íðefni sem litlar eða engar eiturefnafræðilegar upplýsingar eru tiltækar fyrir og getur verið annar valkostur í stað þess að gera tvær aðskildar prófanir, annars vegar á eiturhrifum við endurtekna skammta (OECD-viðmiðunarregla 407 um prófanir, sem samsvarar kafla B.7 í þessum viðauka) og hins vegar á eiturhrifum á æxlun/þroskun (OECD-viðmiðunarregla 421 um prófanir, sem samsvarar kafla B.63 í þessum viðauka). Einnig er hægt að nota hana sem skammtastærðarannsókn fyrir ítarlegri rannsóknir á æxlun/þroskun eða þegar það telst viðeigandi af öðrum ástæðum.

11. Almennt er gert ráð fyrir að munur sé á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Af þessum sökum getur verið flóknara að ákvarða skammtastærðir í þessari sameinuðu prófun, sem eru fullnægjandi til að meta bæði almenn, altæk eiturhrif og tiltekin eiturhrif á æxlun/þroskun, en þegar sjálfstæðar prófanir eru framkvæmdar. Þar að auki getur túlkun niðurstaðna úr prófunum, að því er varðar almenn, altæk eiturhrif, verið erfiðari en þegar aðskilin rannsókn með endurteknum skömmtum er framkvæmd, einkum þegar breytur sem varða sermi og vefjameinafræðilegar athuganir eru ekki metnar á sama tíma í rannsókninni. Vegna þessa tæknilega flækjustigs þarf umtalsverða reynslu af prófunum á eiturhrifum til að framkvæma þessa sameinuðu skimunarprófun. Á hinn bóginn, að því undanskildu að færri dýr eru notuð, getur sameinaða prófunin boðið upp á betri leiðir til að greina á milli beinna áhrifa á æxlun/þroskun og áhrifa sem leiða af öðrum (altækum) áhrifum.

12. Í þessari prófun er skömmtunartímabilið lengra en í hefðbundinni 28 daga rannsókn með endurteknum skömmtum. Í henni eru þó notuð færri dýr af hvoru kyni í hvern hóp þegar borið er saman við ástandið þegar hefðbundin 28 daga rannsókn með endurteknum skömmtum er framkvæmd til viðbótar við skimunarprófun fyrir eiturhrifum á æxlun/þroskun.

13. Í þessari prófunaraðferð er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið sé gefið um munn. Það getur reynst nauðsynlegt að gera breytingar ef aðrar váhrifaleiðir eru notaðar.

14. 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.

15. Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

16. Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunaríðefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýr skulu fá skammta í a.m.k. fjórar vikur, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag (að lágmarki í tvær vikur fyrir pörun, á pörunartímabilinu og í u.þ.b. tvær vikur eftir pörun). Í ljósi þess hversu takmarkað skömmtunartímabilið er hjá karldýrum fyrir pörun er frjósemi e.t.v. ekki sérlega næmur mælikvarði á eiturhrif á eistu. Því er nauðsynlegt að framkvæma ítarlega, vefjafræðilega

rannsókn á eistunum. Samsetning tveggja vikna skömmtunartímabils fyrir pörun og seinni athuganir á pörun/frjósemi ásamt heildarskömmtunartímabili sem er a.m.k. fjórar vikur, sem er fylgt eftir með ítarlegri vefjameinafræðilegri rannsókn á kynkirtlum karldýranna, telst fullnægjandi til að gera kleift að greina meirihluta áhrifa á frjósemi karldýra og sæðismyndun.

17. Kvendýr skulu fá skammta meðan á rannsókninni stendur. Þetta nær yfir tvær vikur fyrir pörun (með það að markmiði að ná yfir a.m.k. tvo heila gangferla), breytilegan tíma fram að getnaði, lengd meðgöngunnar og a.m.k. þrettán daga að loknu goti, til og með dagsins fyrir áætlaðan aflífunardag.

18. Lengd rannsóknar eftir aðlögun og mat á gangferli fyrir skammtagjöf fer eftir háttalagi kvendýrsins og er u.þ.b. 63 dagar, [a.m.k. 14 dagar fyrir pörun, (allt að) 14 daga pörun, 22 daga meðgöngutími, 13 daga mjólkurskeið].

19. Dýrin eru skoðuð vandlega daglega á inngjafartímabilinu til að greina merki um eiturhrif. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Val á dýrategund

20. Þessi prófunaraðferð er ætluð til prófunar á rottum. Ef mæliþættirnir, sem tilgreindir eru í þessari viðmiðunarreglu 422, eru rannsakaðir í öðrum nagdýrum skal rökstyðja það ítarlega. Í alþjóðlegu fullgildingaráætluninni til að greina innkirtlatruflandi efni, að því er varðar viðmiðunarreglu 407, var rottan eina tegundin sem var notuð. Ekki skal nota stofna ef frjósemi þeirra er lítil eða vitað er að þroskunargallar eru algengir. Nota skal heilbrigð dýr, sem hafa aldrei fengið fang, sem hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, kyn, þyngd og aldur tilraunadýranna. 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. Ef rannsóknin er gerð sem forrannsókn langtímarannsóknar eða rannsóknar á heilli kynslóð er ákjósanlegt að dýr af sama stofni og uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

Aðbúnaður og fóðrun

21. Öll verkferli skulu vera í samræmi við staðbundna staðla um umönnun tilraunadýra. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 ºC (± 3 °C). Rakastig skal vera a.m.k. 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilýsingu og ljóslotan skal vera 12 klukkustundir af birtu 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.

22. Dýrin skulu vera í búri með litlum hópum af sama kyni en þau má hafa hvert í sínu búri ef færð eru vísindaleg rök fyrir því. Þegar dýr eru saman í búri skulu þau ekki vera fleiri en fimm í hverju búri. Pörun skal fara fram í búrum sem eru til þess hentug. Koma skal kvendýrum með fangi hverju fyrir sig í búr og láta þau fá efni til að gera sér bæli. Mjólkandi kvendýrum er komið hverju fyrir sig í búr ásamt afkvæmum þeirra.

23. Greina skal fóðrið reglulega með tilliti til aðskotaefna. Halda skal til haga sýni úr fæðunni þar til skýrslan er tilbúin.

Undirbúningur dýranna

24. Heilbrigð, ung, fullvaxin dýr eru valin af handahófi og skipað í meðferðarhópana og búrin. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

Tilreiðsla skammta

25. Mælt er með því að prófunaríðefnið sé gefið um munn nema aðrar íkomuleiðir séu taldar heppilegri. Þegar inngjöf um munn er valin er prófunaríðefnið yfirleitt gefið með magafóðrun; þó má að öðrum kosti gefa prófunaríðefni inn með fóðri eða drykkjarvatni.

26. Ef nauðsyn krefur er prófunaríðefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/sviflausnir í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/sviflausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða skal stöðugleika og einsleitni prófunaríðefnisins í burðarefninu.

VERKFERLI

Fjöldi og kyn dýra

27. Mælt er með því að hver hópur innihaldi í upphafi a.m.k 10 karldýr og 12–13 kvendýr. Gangferill kvendýranna er metinn fyrir váhrif og þau dýr sem sýna ekki hefðbundinn 4–5 daga gangferil skulu ekki höfð með í rannsókninni; því er mælt með því að hafa aukakvendýr til að ná upp í 10 kvendýr í hvern hóp. Búist er við að þetta gefi a.m.k. 8 kvendýr með fangi í hverjum hóp, sem er venjulega sá lágmarksfjöldi sem telst viðunandi af kvendýrum með fangi í hverjum hóp, nema ef um er að ræða greinileg eiturhrif. Markmiðið er að fá fram nægilega margar þunganir og afkvæmi til að marktækt mat fáist á mætti prófunaríðefnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu, atferli mæðra og mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F1-afkvæmanna frá getnaði fram að 13. degi eftir got. Ef áform eru um að aflífa dýr í tilrauninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok tilraunarinnar. Vega skal og meta að bæta við fimm dýra fylgihóp af hvoru kyni í samanburðarhópinn og hópinn sem fær stærsta skammtinn svo að hægt sé að fylgjast með þeim í a.m.k. 14 daga eftir meðferð til að kanna hvort altæk eiturhrif ganga til baka, eru þrávirk eða síðkomin. Dýr úr fylgihópunum eru ekki pöruð og af þeim sökum eru þau ekki notuð til að meta eiturhrif á æxlun/þroskun.

Skammtur

28. Almennt skal nota a.m.k. þrjá prófunarhópa og samanburðarhóp. Ef ekki eru til viðeigandi gögn um almenn eiturhrif er hægt að gera skammtastærðarannsókn (með dýrum af sama stofni og uppruna) til að auðvelda ákvörðun á því hvaða skammta skuli nota. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunaríðefnið. Ef burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu.

29. Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturhrif og eiturefnahvörf. Einnig skal taka tillit til þess að það kann að vera munur á næmleika dýra með fangi og dýra sem eru ekki með fangi. Stærsta skammtastærðin er valin með það fyrir augum að hún valdi eiturhrifum en ekki dauða eða greinilegum þjáningum. Eftir það skal velja röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð. Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10).

30. Ef almennra eiturhrifa verður vart (t.d. minni líkamsþyngd, áhrif á lifur, hjarta, lungu eða nýru o.s.frv.) eða annarra breytinga sem eru e.t.v. ekki eiturefnasvörun (t.d. minna fóðurát, stækkun lifur), skulu þau áhrif sem verður vart á næma endapunkta innkirtla túlkuð með fyrirvara.

Markprófun

31. Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri (byggist á ákvörðun líkamsþyngdar), þar sem notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, framkallar engin merkjanleg eiturhrif og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með skylda efnabyggingu kann fullnaðarrannsókn með mörgum skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammtastærð. Þegar ákomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, ákvarðast hámarksváhrif sem hægt er að ná oft af eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnanna.

Gjöf skammta

32. Dýrunum er gefið prófunaríðefnið daglega, sjö daga vikunnar. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið skal ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir

en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar . Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi prófunaríðefni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

33. Þegar um er að ræða prófunaríðefni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunaríðefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Þegar prófunaríðefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð, miðað við líkamsþyngd dýranna og skal taka það fram hvor leiðin er farin. Ef prófunaríðefnið er gefið með magafóðrun skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega svo að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Ef sameinuð rannsókn er undanfari langtíma- eða fullnaðarrannsóknar á eiturhrifum á æxlun skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

Tilraunaáætlun

34. Skömmtun hjá báðum kynjum skal hefjast tveimur vikum fyrir pörun eftir að þau hafa verið látin aðlagast aðstæðum í a.m.k fimm daga og kvendýrin hafa verið skimuð fyrir eðlilegum gangferlum (á tveggja vikna formeðferðartímabili). Rannsóknin skal skipulögð þannig að mat á gangferli hefjist fljótlega eftir að dýrin hafa náð fullum kynþroska. Þetta getur verið aðeins breytilegt milli mismunandi rottustofna á mismunandi rannsóknarstofum, t.d. hjá rottum af stofninum Sprague Dawley þegar þær eru 10 vikna gamlar og hjá rottum af stofninum Wistar þegar þær eru u.þ.b. 12 vikna gamlar. Mæður með afkvæmi skal aflífa á 13. degi eftir got eða stuttu síðar. Til að gera það kleift að láta mæður fasta nóttina fyrir blóðsöfnun (ef þessi kostur er valinn) er ekki nauðsynlegt að aflífa mæðurnar og afkvæmi þeirra á sama degi. Gotdagurinn (þ.e. þegar goti er lokið) er skilgreindur sem dagur 0 eftir got. Kvendýr sem sýna engin merki um mökun eru aflífuð 24–26 dögum eftir síðasta dag pörunartímabilsins. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á pörunartímabilinu. Karldýr skulu áfram fá skammta eftir pörunartímabilið a.m.k. þar til að lágmarki 28 daga heildarskömmtunartímabili hefur verið náð. Þau eru síðan aflífuð eða, að öðrum kosti, skömmtun er haldið áfram fyrir hugsanlega pörun í annað skipti ef ástæða þykir til.

35. Kvendýr af foreldrakynslóðinni skulu áfram fá daglega skammta meðan á meðgöngu stendur og a.m.k. fram að 13. degi eftir got og að honum meðtöldum eða þangað til daginn fyrir aflífun. Að því er varðar rannsóknir þar sem prófunaríðefnið er gefið við innöndun eða með íkomuleið um húð skal halda skömmtun áfram a.m.k. fram að 19. degi meðgöngu og að honum meðtöldum og hefja skal skömmtun aftur eins fljótt og auðið er og ekki síðar en á 4. degi eftir got.

36. Dýr úr fylgihópi sem er ætlaður til eftirfylgniathugana, ef hann er hafður með, skulu ekki pöruð. Þeim skal haldið í a.m.k. 14 daga til viðbótar eftir fyrstu áætlaða aflífun mæðra, án meðferðar, til að kanna hvort eiturhrifin eru síðkomin, þrávirk eða ganga til baka.

37. Skýringarmynd af tilraunaáætluninni er að finna í 2. viðbæti.

Gangferlar

38. Vakta skal gangferla áður en meðferð hefst til að velja kvendýr með reglulega gangferla fyrir rannsóknina (sjá 27. lið). Strok úr leggöngum skal einnig vakta daglega frá upphafi meðferðartímabilsins þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Ef áhyggjur vakna af bráðum streituáhrifum, sem gætu breytt gangferlum, við upphaf skömmtunar geta rannsóknarstofur látið tilraunadýrin verða fyrir váhrifum í tvær vikur og síðan safnað stroki úr leggöngum daglega til að vakta gangferil í a.m.k. tvær vikur á tímabilinu fyrir pörun og haldið vöktun áfram á pörunartímabilinu þar til staðfest er að pörun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (8.–9. heimild).

Pörunaraðferð

39. Að jafnaði skal nota 1:1 pörun (eitt karldýr fyrir hvert kvendýr) í þessari rannsókn. Frávik geta komið upp ef um er að ræða að karldýr drepast. Kvendýrið skal haft hjá sama karldýrinu þar til vísbendinga um mökun verður vart eða tvær vikur eru liðnar. Á hverjum morgni er leitað að sæði eða leggangatappa í kvendýrunum. Dagurinn þegar staðfestar vísbendingar eru um pörun (leggangatappi eða sæði finnst) telst vera dagur 0 á meðgöngu. Ef pörun mistekst má reyna að para kvendýrið á ný saman við karldýr úr sama hópnum sem hefur reynst frjótt.

Stærð gots

40. Á 4. degi eftir got má aðlaga stærð hvers gots með því að fjarlægja aukaunga með slembivali til að eftir verði, eins nálægt því og mögulegt er, fjórir eða fimm ungar af hvoru kyni í hverju goti með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður. Taka skal blóðsýni úr tveimur umframungum, hópa þau og nota til að ákvarða magn T4 í sermi. Valvís fjarlæging unga, t.d. á grundvelli líkamsþyngdar eða bils milli endaþarmsops og ytri kynfæra, er ekki viðeigandi Þegar fjöldi karlkyns eða kvenkyns unga gefur ekki kost á fjórum eða fimm af hvoru kyni í hverjum goti má nota ófullkomna aðlögun (t.d. sex karldýr og fjögur kvendýr). Engir ungar skulu fjarlægðir þegar gotstærðin fer undir aflífunarviðmiðið (8 eða 10 ungar/got). Ef einungis er einn ungi umfram aflífunarviðmiðið skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

41. Ef gotstærð er ekki aðlöguð eru tveir ungar úr hverju goti aflífaðir á 4. degi eftir got og blóðsýni tekin til að mæla styrkleika skjaldkirtilshormóna í sermi. Ef hægt er skulu ungarnir tveir úr hverju goti vera kvendýr, til að geyma karlkynsungana fyrir mat á geymd geirvörtu, nema fjarlæging þessara unga verði til þess að engin kvendýr verði eftir fyrir mat við lok prófunarinnar. Ekki skal fjarlægja unga þegar gotstærð er undir 8 eða 10 ungar/got (með hliðsjón af venjulegri gotstærð hjá þeim rottustofni sem er notaður). Ef einungis er einn ungi umfram venjulega gotstærð skal einungis fjarlægja einn unga og nota til blóðsöfnunar fyrir hugsanlegt mat á T4 í sermi.

Athuganir

42. Almennar klínískar athuganir skulu gerðar a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með það í huga hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Skrá skal heilbrigðisástand dýranna. Öll dýr eru skoðuð a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til dánar- og veikindatilvika.

43. Gera skal ítarlegar klínískar athuganir á öllum dýrum af foreldrakynslóð, í eitt skipti á undan fyrstu váhrifum (til að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri), og a.m.k. vikulega eftir það. Þessar athuganir skulu fara fram í stöðluðu rými utan búrs dýranna og helst alltaf á sama tíma daglega. Þær skulu vandlega skráðar og helst skal styðjast við stigakerfi sem prófunarstofan hefur skilgreint vandlega. Áríðandi er að tryggja að prófunarskilyrði séu sem jöfnust og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til meðferðarinnar. Merki sem fylgst er með skulu fela í sér, en ekki takmarkast við, breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslosun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og vöðvakippi og vöðvaspennu, staðnað atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hringi), erfitt eða langvarandi got eða afbrigðilegt atferli (t.d. sjálfssköddun eða ef dýrin ganga aftur á bak) (10. heimild).

44. Einu sinni meðan á rannsókninni stendur skal meta skynviðbrögð við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- og sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri) (8.–9. og 11. heimild), mat á gripstyrk (12. heimild) og mat á hreyfistarfsemi (13. heimild) hjá fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi. Nánari lýsing á verkferlunum, sem fylgja má, er að finna í þeim heimildum sem vísað er til. Hins vegar má einnig nota annars konar verkferli en þau sem vísað er til. Hjá karldýrum skal gera þessar athuganir á starfrænum þáttum undir lok skömmtunartímabils þeirra, skömmu fyrir áætlaðan aflífunardag en fyrir blóðsýnatöku fyrir blóðfræði eða klíníska efnafræði (sjá 53.–56. lið, þ.m.t. 1. neðanmálsgrein.) Kvendýr skulu vera í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi meðan á þessum starfrænu prófunum stendur og skal helst framkvæma prófanir á þeim einu sinni í síðustu viku mjólkurskeiðsins (t.d. á 6.–13. mjólkurskeiðsdegi), skömmu fyrir áætlaðan aflífunardag. Lágmarka skal aðskilnaðartíma mæðra og unga að því marki sem mögulegt er.

45. Sleppa má athugunum á starfrænum þáttum, sem gerðar eru einu sinni undir lok rannsóknarinnar, þegar um er að ræða forrannsókn sem er gerð sem undanfari 90 daga rannsóknar á hálflangvinnum eiturhrifum eða langtímarannsóknar. Í þeim tilvikum ættu athuganir á starfrænum þáttum að vera hluti af síðari rannsókninni. Hins vegar geta upplýsingar um athuganir á starfrænum þáttum úr þessari rannsókn með endurteknum skammti auðveldað valið á skammtastærðum fyrir síðari rannsóknir á hálflangvinnum eiturhrifum eða langtímarannsóknir.

46. Í undantekningartilvikum má einnig sleppa athugun á starfrænum þáttum þegar um er að ræða hópa sem sýna svo greinileg merki um eiturhrif að það myndi hafa veruleg áhrif á niðurstöður úr prófunum á starfrænum þáttum.

47. Lengd meðgöngutíma skal skráð og hún er reiknuð frá degi 0 á meðgöngu. Rannsaka skal hvert got eins fljótt og hægt er að loknu goti til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra unga, fjölda lifandi unga, ófullburða unga (unga sem eru talsvert minni en samsvarandi samanburðarungar) og stórsæjan afbrigðileika.

48. Lifandi ungar skulu taldir og kyn þeirra ákvarðað og gotið skal vigtað innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Auk athugana á dýrum af foreldrakynslóð (sjá 43. og 44. lið) skal skrá allt óeðlilegt atferli afkvæmanna.

49. Mæla skal bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra hvers unga á sama degi eftir got, á bilinu frá degi 0 eftir got fram til loka 4. dags eftir got. Mæla skal líkamsþyngd unganna sama dag og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra skal staðlað miðað við mælieiningu fyrir stærð unga, helst þriðju rót af líkamsþyngd (14. heimild). Telja skal fjölda geirvartna/vörtubauga hjá karlkynsungum á 12. eða 13. degi eftir got, eins og mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 151 (15. heimild).

Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja

50. Karl- og kvendýr skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtunar, a.m.k. vikulega eftir það og við lok prófunar. Kvendýr skulu vigtuð á meðgöngunni á degi 0, á 7., 14. og 20. degi og innan 24 klst. eftir got (dagur 0 eða 1 eftir got) og a.m.k. á 4. og 13. degi eftir got. Þessar athuganir skal skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig.

51. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu fyrir pörun, á meðgöngu og á mjólkurskeiði. Mælingar á fóðuráti á pörunartímabilinu eru valkvæðar. Einnig skal mæla vatnsdrykkju á þessum tímabilum þegar prófunaríðefnið er gefið inn með þeim miðli.

Blóðfræði

52. Blóðrannsóknir varðandi eftirfarandi þætti skulu fara fram einu sinni meðan á rannsókninni stendur á fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi: blóðkornaskil, blóðrauðastyrkur, rauðkornafjöldi, netfrumur, heildarhvítkornafjöldi og deilitalning hvítkorna, blóðflögufjöldi og mæling á storknunartíma og storkunarhæfni blóðs. Aðrar ákvarðanir, sem skulu gerðar ef prófunaríðefnið eða meint umbrotsefni þess hafa eða eru grunuð um að hafa oxunareiginleika, eru m.a. ákvarðanir á methemóglóbínstyrk og Heinz-innlyksum (e. *Heinz bodies*).

53. Taka skal blóðsýni á tilteknum stað. Kvendýr skulu vera í svipuðu lífeðlisfræðilegu ástandi meðan á sýnatöku stendur. Í því skyni að forðast örðugleika í framkvæmd í tengslum við breytileika við upphaf meðgöngu er hægt að safna blóði úr kvendýrum í lok tímabilsins áður en pörun á sér stað í stað söfnunar rétt fyrir eða í tengslum við aflífun dýranna. Blóðsýni úr karldýrum skal helst taka rétt fyrir eða í tengslum við aflífun dýranna. Að öðrum kosti er einnig er hægt að safna blóði úr karldýrum í lok tímabilsins áður en pörun á sér stað ef sá tímapunktur var valinn fyrir kvendýr.

54. Geyma skal öll blóðsýni við viðeigandi skilyrði.

Klínísk lífefnafræði

55. Gera skal klíniskar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum, sem tekin eru úr þeim fimm karldýrum og fimm kvendýrum sem valin eru úr hverjum hópi, til að rannsaka helstu eiturhrif í vefjum, einkum áhrif á nýru og lifur. Mælt er með því að dýrin séu látin fasta nóttina áður en blóðsýnin eru tekin ([1]). Rannsóknir á blóðvökva eða sermi skulu ná yfir natríum, kalíum, glúkósa, heildarkólesteról, þvagefni, kreatínín, heildarprótín og albúmín, a.m.k. tvö ensím sem geta bent til áhrifa á lifrarfrumur (t.d. alanínamínótransferasa, aspartatamínótransferasa og sorbítólvetnissvipti) og gallsýru. Mælingar á fleiri ensímum (úr lifur eða öðrum líffærum) og gallrauða geta í sumum tilvikum gefið gagnlegar upplýsingar.

56. Blóðsýni eru tekin úr skilgreindum stað á grundvelli eftirfarandi áætlunar:

— úr a.m.k. tveimur ungum í hverju goti á 4. degi eftir got ef fjöldi unga gerir það kleift (sjá 40.–41. lið)

— úr öllum mæðrum og a.m.k. tveimur ungum í hverju goti við lok prófunarinnar á 13. degi, og

— úr öllum fullvöxnum karldýrum við lok prófunarinnar.

Öll blóðsýni eru geymd við viðeigandi skilyrði. Blóðsýni úr ungum á 13. degi og fullvöxnum karldýrum eru metin m.t.t. styrkleika skjaldkirtilshormóna (T4) í sermi. Framkvæma skal frekara mat á T4 í blóðsýnum úr mæðrum og ungum á 4. degi ef við á. Annar valkostur er að mæla önnur hormón, ef við á. Hægt er að hópa blóð úr ungum eftir goti til greiningar á skjaldkirtilshormónum. Skjaldkirtilshormóna (T4 og TSH) skal helst mæla sem eitt heildargildi.

([1]) Við allmargar mælingar á sermi og blóðvökva, einkum þegar glúkósi er mældur, er betra að láta dýrin fasta yfir nótt. Aðalástæðan er sú að óhjákvæmilega verða niðurstöður breytilegri ef dýrin eru ekki látin fasta og það getur falið þau áhrif sem eru lítt áberandi og gert túlkun erfiðari. Á hinn bóginn gæti fasta yfir nótt haft áhrif á almenn efnaskipti dýranna (með fangi), truflað mjólkurmyndun og gjöf, og það gæti einkum truflað dagleg váhrif frá prófunaríðefninu, einkum í rannsóknum þar sem efnið er gefið með fóðri. Ef dýrin eru látin fasta yfir nótt skulu klíniskar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar eftir að athuganir á starfrænum þáttum hjá karldýrum í 4. viku rannsóknarinnar hafa farið fram. Mæðrum skal haldið eftir í einn dag til viðbótar eftir að ungarnir eru fjarlægðir, t.d. á 13. degi eftir got. Mæður skulu látnar fasta yfir nótt frá 13.–14. mjólkurskeiðsdegi og blóðið frá lokum rannsóknarinnar er notað sem þættir í klínískri lífefnafræði.

57. Valkvætt er hvort eftirfarandi greiningar eru gerðar á þvagsýnum sem tekin eru með tímasettri söfnun þvags úr fimm karldýrum, sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi, í síðustu viku rannsóknarinnar til ákvörðunar á: útliti, rúmmáli, osmólalstyrk eða eðlisþyngd, pH-gildi, prótíni, glúkósa og blóði/blóðkornum.

58. Að auki kemur til álita að rannsaka sermimerki sem benda til almennra vefjaskemmda. Aðrar mælingar sem ætti að gera ef þekktir eiginleikar prófunaríðefnisins geta haft, eða grunur leikur á að þeir hafi, áhrif á tilsvarandi efnaskiptamynstur eru mælingar á kalsíumi, fosfati, þríglýseríði við föstu og glúkósa við föstu, tilteknum hormónum, methemóglóbíni og kólínesterasa. Þetta þarf að greina í hverju tilviki um sig.

59. Eftirfarandi þættir geta haft áhrif á breytileika og hreinan styrk við ákvörðun á hormónum:

— aflífunartími vegna daglegs breytileika í hormónastyrkleikum

— aðferð við aflífun til að koma í veg fyrir óþarfa álag á dýrin sem gæti haft áhrif á hormónastyrkleika

— prófunarsett fyrir ákvarðanir á hormónum sem geta haft mismunandi staðalferla.

60. Blóðvökvasýni, sem eru sérstaklega ætluð til ákvörðunar á hormónum, skal taka á svipuðum tíma dags. Tölugildin sem fást þegar hormónastyrkleikar eru greindir eru breytileg eftir því hver hinna ýmsu greiningarsetta á markaði eru notuð.

61. Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega að mæla blóðfræðilegar og klínískar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst eða, sem væri ákjósanlegast, hjá hópi dýra sem eru ekki í tilraunahópunum. Að því er varðar kvendýr verða gögnin að koma frá mjólkandi dýrum.

MEINAFRÆÐI

Stórsæ krufning

62. Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum fullvöxnum dýrum í rannsókninni og skal m.a. rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum: Skrá skal fjölda tilvika hreiðrunar. Á krufningardegi er skoðað strok úr leggöngum til að ákvarða hvar dýrin eru stödd í gangferlinum og til að ná fram samsvörun við vefjameinafræðilega rannsókn á æxlunarfærum kvendýra.

63. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá eistum og eistalyppum, sem og blöðruhálskirtli og sáðblöðrum með hlaupkirtlum í heild sinni, allra fullvaxinna karldýra, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Að auki er valkvætt að vigta fleiri líffæri s.s. lyftivöðva endaþarms og klumbu- og vattarvöðvann, klumbukirtla og reðurhúfu karldýra og eggjastokka (blautvigt) og leg (þ.m.t. legháls) kvendýra; ef þessar vigtanir eru hafðar með skulu þær framkvæmdar eins fljótt og hægt er eftir krufningu. Varðveita skal eggjastokka, eistu, eistalyppur, aukalíffæri kynkerfis og öll líffæri sem sýna stórsæjar vefjaskemmdir úr öllum fullvöxnum dýrum.

64. Varðveita skal skjaldkirtil úr öllum fullvöxnum karl- og kvendýrum og úr einum karldýrsunga og einum kvendýrsunga á 13. degi úr hverju goti í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur fyrir fyrirhugaðar vefjameinafræðilegar rannsóknir. Þyngd skjaldkirtils er hægt að mæla eftir festingu. Einnig skal skorið frá með mikilli varúð og eingöngu eftir festingu til að koma í veg fyrir vefjaskemmdir. Vefjaskemmdir geta spillt vefjameinafræðilegri greiningu. Taka skal blóðsýni á tilteknum stað, rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð, og geyma þau við viðeigandi skilyrði (sjá 56. lið).

65. Að því er varðar a.m.k. fimm fullorðin karldýr og kvendýr, sem eru valin af handahófi úr hverjum hópi (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð áður en rannsókninni lýkur), skal þar að auki skera alla aðliggjandi vefi frá lifur, nýrum, nýrnahettum, hóstakirtli, milta, heila og hjarta, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu til að komast hjá því að þau þorni. Eftirfarandi vefir skulu varðveittir í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefjar og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili (helstu svæði, þar á meðal stórheili, litli heili og heilabrú), mæna, augu, magi, garnir og þarmar (þar á meðal fjöleitlingar (e. *Peyer's patches*)), lifur, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, hóstarkirtill, barki og lungu (varðveitt með fyllingu af festiefni og síðan ídýfingu), kynkirtlar (eistu og eggjastokkar), aukalíffæri kynkerfis (leg og

legháls, eistalyppur, blöðruhálskirtill, sáðblöðrur og hlaupkirtlar), leggöng, þvagblaðra, eitlar (auk nærlægasta dreneitils er rétt að taka annan eitil ef það er reynsla rannsóknarstofunnar (16. heimild)), úttaug (set- eða sköflungstaug), helst í námunda við vöðvann, beinagrindarvöðvi og bein, með beinmergi (sneið eða, að öðrum kosti, nýlegt beinmergssýni). Mælt er með því að eistu séu fest með ídýfingu í Bouin-festiefni eða breytt Davidson-festiefni (16.–18. heimild); ekki er mælt með formalíni sem festingu fyrir þessa vefi. Gata má hvíthjúpinn varlega og grunnt með nál á báðum endum líffærisins til að auðvelda gegnumflæði festiefnisins. Niðurstöður, bæði klínískar og aðrar, geta bent til þess að rannsaka þurfi fleiri vefi. Einnig skal varðveita öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri út frá þekktum eiginleikum prófunaríðefnisins.

66. Eftirfarandi vefir kunna að veita mikilvægar vísbendingar um innkirtlatengd áhrif: Kynkirtlar (eggjastokkar og eistu), aukalíffæri kynkerfis (leg, þ.m.t. legháls, eistalyppur, sáðblöðrur með hlaupkirtlum, bak-, hliðar- og kviðlægur blöðruhálskirtill), leggöng, heiladingull, mjólkurkirtill úr karldýri og nýrnahetta. Breytingar á mjólkurkirtlum í karldýrum hafa ekki verið nægilega skjalfestar en þessi mæliþáttur getur verið afar næmur fyrir efnum með estrógenvirkni. Athugun á líffærum/vefjum sem ekki eru skráðir í 65. lið er valkvæð.

67. Dauða unga og unga sem eru aflífaðir á 13. degi eftir got eða stuttu síðar skal a.m.k. skoða vandlega m.t.t. stórsærra afbrigðileika. Gefa skal sérstakan gaum að ytri æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávik frá eðlilegri þroskun.

Vefjameinafræðileg rannsókn

68. Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum valinna dýra í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn (þar sem sérstök áhersla er lögð á stig sæðismyndunar í kynkirtlum karldýra og vefjameinafræðilega rannsókn á byggingu millifruma í eistum). Skjaldkirtil úr ungum og fullvöxnum dýrum, sem eftir eru, má rannsaka þegar þörf krefur. Þessar rannsóknir skulu einnig ná til dýra úr öðrum skammtahópum ef meðferðartengdar breytingar koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Í leiðbeiningum um vefjameinafræði (10. heimild) er að finna fleiri upplýsingar um krufningu, festingu, sneiðingu og vefjameinafræðilega rannsókn á innkirtlavefjum.

69. Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir. Til að fá skýrari vitneskju um mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif skal rannsaka marklíffæri í öðrum skammtahópum, einkum í hópum sem eru taldir sýna mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif.

70. Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í meðferðarhópunum.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

71. Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Að auki skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana, fjöldi frjórra dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta. Snið yfirlitsskýrslu í töfluformi, sem hefur reynst mjög gagnleg við mat á áhrifum á æxlun/þroskun, er að finna í 3. viðbæti.

72. Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri, tölfræðilegri aðferð. Við samanburð á áhrifum á tilteknu skammtabili skal forðast notkun á mörgum t-prófunum. Velja skal tölfræðiaðferðirnar á hönnunarstigi rannsóknarinnar. Tölfræðileg greining á bili milli endaþarmsops og ytri kynfæra og á geymd geirvörtu skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til áhrifa frá goti. Eftir því sem við á er gotið greiningareiningin. Tölfræðileg greining á líkamsþyngd unga skal byggjast á gögnum fyrir hvern unga, að teknu tilliti til stærðar gotsins. Vegna takmarkaðs umfangs rannsóknarinnar hafa tölfræðilegar greiningar í formi prófana m.t.t. „marktækni“ takmarkað gildi að því er varðar marga endapunkta, einkum æxlunarendapunkta. Sumar þeirra aðferða sem oftast eru notaðar, einkum stikabundin próf til að mæla miðlægt gildi, eiga ekki við. Ef tölfræðilegar greiningar eru notaðar skal aðferðin, sem valin er, hæfa dreifingu breytanna sem rannsakaðar eru og hún skal valin áður en rannsóknin hefst.

Mat á niðurstöðum

73. Meta skal niðurstöðurnar úr þessari rannsókn á eiturhrifum með tilliti til þeirra áhrifa sem verður vart, niðurstaðna úr krufningum og smásjárrannsóknum. Matið skal ná til tengsla milli skammtsins af prófunaríðefninu annars vegar og þess hvort frávik koma fram eða ekki og tíðni og alvarleika afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, ófrjósemi, klínísk frávik, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturhrif.

74. Sökum þess að meðferðartímabil karldýranna er stutt skal skoða vefjameinafræðilega rannsókn á eistum og eistalyppum ásamt frjósemisgögnunum þegar áhrif á æxlun karldýra eru metin. Notkun rannsóknarsögulegra samanburðargagna um æxlun/þróun (t.d. um stærð gots, bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra, geymd geirvörtu, magn T4 í sermi), ef þau liggja fyrir, getur einnig verið gagnleg til að auðvelda túlkun á rannsókninni.

75. Að því er varðar gæðaeftirlit þá er mælt með því að rannsóknarsögulegum samanburðargögnum verði safnað saman og að fráviksstuðull verði reiknaður út fyrir töluleg gögn, einkum fyrir mæliþættina sem tengjast greiningu á innkirtlatruflandi efnum. Þessi gögn má nota til samanburðar þegar raunverulegar rannsóknir eru metnar.

Prófunarskýrsla

76. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

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.

Burðarefni (ef við á):

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

Tilraunadýr:

— tegund eða stofn sem er notaður,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunarinnar,

— rökstuðningur fyrir öðrum tegundum en rottum.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um samsetningu prófunaríðefnisins eða blöndun þess í fóður, styrk sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— umreikningur á styrk prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— nákvæm lýsing á verklagi við slembiröðun við val á ungum sem skal aflífa, ef aflífun fer fram.

Niðurstöður:

— líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,

— fóðurát og vatnsdrykkja, ef við á,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. frjósemi, meðganga og öll önnur merki um eiturhrif,

— lengd meðgöngu,

— eiturhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir got o.s.frv.,

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— mat á starfsemi skynfæra, gripstyrk og hreyfistarfsemi,

— blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,

— fjöldi fullvaxinna kvendýra með eðlilegan eða afbrigðilegan gangferil og gangferilslengd,

— fjöldi lifandi fæddra unga og fósturláta eftir hreiðrun,

— fjöldi unga með stórsæjan afbrigðileika, almennt mat á ytri kynfærum, fjöldi ófullburða afkvæma,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— fjöldi hreiðrana, gotstærð og þyngd gots á skráningartímanum,

— upplýsingar um líkamsþyngd unga,

— bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra allra unga (og líkamsþyngd sama dag og bilið milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt),

— geymd geirvörtu hjá karlkynsungum,

— skjaldkirtilshormónagildi, ungar á 13. degi og fullvaxin karldýr (og mæður og ungar á 4. degi, ef mæld),

— líkamsþyngd við aflífun og gögn um þyngd líffæra úr dýrum af foreldrakynslóð,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Ályktanir.

Túlkun niðurstaðna

77. Í þessari rannsókn eru eiturhrif á æxlun/þroskun metin í tengslum við endurtekna skammtagjöf. Þar eð áhersla er bæði lögð á endapunkta fyrir almenn eiturhrif og eiturhrif á æxlun/þroskun gera niðurstöðurnar úr rannsókninni einkum kleift að greina á milli þeirra áhrifa á æxlun/þroskun, sem koma fram þótt ekki sé um almenn eiturhrif að ræða, og áhrifa sem koma aðeins fram þegar skammtarnir eru einnig eitraðir fyrir dýr af foreldrakynslóðinni (sjá 7.–11. lið). Hún getur gefið vísbendingar um nauðsyn þess að gera frekari rannsóknir og getur veitt leiðbeiningar um útfærslu á síðari rannsóknum Styðjast skal við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 43 við túlkun niðurstaðna úr rannsóknum á æxlun og þroskun (19. heimild). Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 106 um vefjafræðilegt mat prófana á innkirtlum og æxlun nagdýra (16. heimild) eru veittar upplýsingar um undirbúning og mat á (innkirtlum) líffærum og stroki úr leggöngum sem getur verið gagnlegt fyrir þessa prófunaraðferð.

HEIMILDIR

1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. Toxicol, Sci., 19, 141-149.

4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. Toxicol., 18, 89-95.

5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). “Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights”, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

15) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Í: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

1. viðbætir

SKILGREININGAR (SJÁ EINNIG (20. HEIMILD) LEIÐBEININGARSKJAL EFNAHAGS- OG FRAMFARASTOFNUNARINNAR NR. 150)

Andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt andrógenhormón (t.d. testósterón) í spendýri.

(and)andrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs andrógenhormóns (t.d. testósteróns) í spendýri.

(and)estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs estrógenhormóns (t.d. estradíóls 17ß) í spendýri.

(and)skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að bæla niður virkni náttúrulegs skjaldkirtilshormóns (t.d. T3) í spendýri.

Íðefni: efni eða blanda.

Eiturhrif á þroskun: birtingarform eiturhrifa á æxlun í formi gerðarrasks (e. *structural disorder*) eða starfsemistruflunar hjá afkvæmunum fyrir fæðingu, í fæðingu eða eftir fæðingu.

Skammtur: það magn prófunaríðefnis sem er gefið. Skammturinn er gefinn upp sem þyngd prófunaríðefnis á hverja líkamsþyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg líkamsþyngdar á dag) eða sem stöðugur styrkur í fóðri.

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Augljós eiturhrif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturhrif í kjölfar þess að prófunaríðefni er gefið. Þau ættu að nægja fyrir hættumat og vera þess eðlis að búast megi við að aukning á gefnum skammti leiði til þess að merki um alvarlega eitrun komi fram og leiði líklega til dauða.

Skerðing á frjósemi: röskun á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- eða kvendýra.

Eiturhrif á móður: skaðleg áhrif á kvendýr með fangi sem eiga sér stað annað hvort á sértækan hátt (bein áhrif) eða ósértækan hátt (óbein áhrif) og tengjast því ástandi að vera með fangi.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“. Þetta er stærsta skammtastærðin sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum vegna meðferðarinnar.

Estrógenvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt estrógenhormón (t.d. estradíól 17ß) í spendýri.

Eiturhrif á æxlun: skaðleg áhrif á afkvæmi og/eða skerðing á tímgunarstarfsemi eða tímgunargetu karl- og kvendýra.

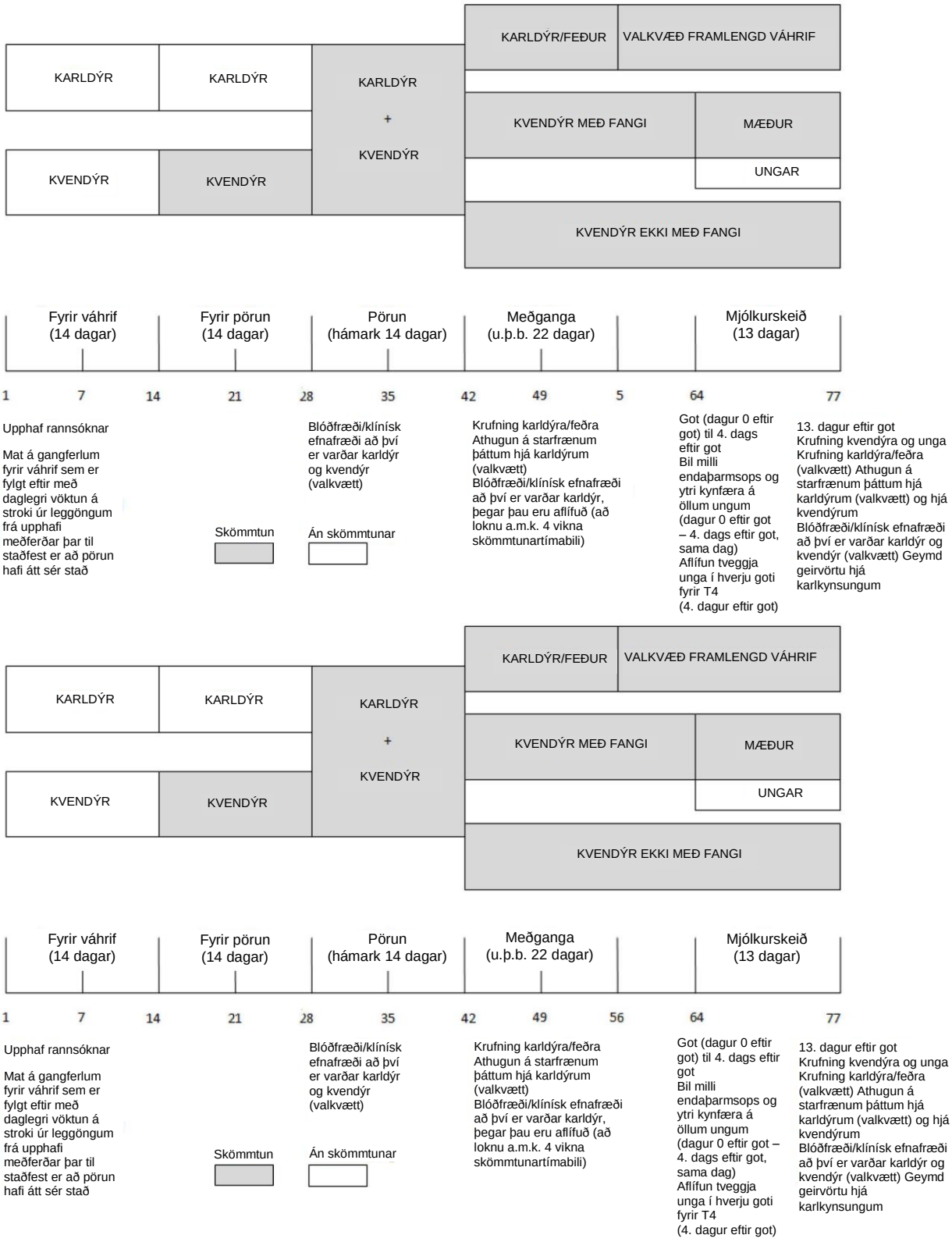
Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Skjaldkirtilsvirkni: eiginleiki íðefnis til að virka eins og náttúrulegt skjaldkirtilshormón (t.d. T3) í spendýri.

Fullgilding: vísindalegt ferli hannað til að lýsa rekstrarlegum kröfum og takmörkunum prófunaraðferðar og til að sýna fram á áreiðanleika og vægi í tilteknum tilgangi.

2. viðbætir

SKÝRINGARMYND AF TILRAUNAÁÆTLUN SEM SÝNIR HÁMARKSLENGD RANNSÓKNAR, BYGGT Á HEILU 14 DAGA PÖRUNARTÍMABILI



3. viðbætir

YFIRLITSSKÝRSLA Í TÖFLUFORMI UM ÁHRIF Á ÆXLUN/ÞROSKUN

ATHUGANIR	GILDI				
Skammtur (einingar).....	0 (saman-burðarsýni)	...	...	...	...
Dýr sett saman í pör (N)					
Gangferill (a.m.k. meðallengd og tíðni óreglulegra ferla)					
Kvendýr sem sýna merki um mökun (N)					
Kvendýr sem hafa fest fang (N)					
Getnaður, dagar 1–5 (N)					
Getnaður, dagar 6–... (1) (N)					
Meðganga ≤ 21 dagur (N)					
Meðganga = 22 dagar (N)					
Meðganga ≥ 23 dagar (N)					
Mæður með lifandi nýfædda unga (N)					
Mæður með lifandi unga á 4. degi eftir got (N)					
Fang/móðir (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður við got (meðaltal)					
Lifandi ungar/mæður á 4. degi (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) við got (meðaltal)					
Kynjahlutfall (kk/kvk) á 4. degi (meðaltal)					
Gotsþyngd við got (meðaltal)					
Gotsþyngd á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga við got (meðaltal)					
Þyngd unga þegar bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra er mælt (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra)					
Bil milli endaþarmsops og ytri kynfæra unga á sama degi eftir got, frá gotdegi – 4. dags (meðaltal karldýra, meðaltal kvendýra, athugasemdir á sama degi eftir got)					

ATHUGANIR	GILDI				
Þyngd unga á 4. degi (meðaltal)					
Þyngd unga á 13. degi (meðaltal)					
Geymd geirvörtu hjá karlkynsungum á 13. degi (meðaltal)					
AFBRIGÐILEGIR UNGAR					
Mæður með 0					
Mæður með 1					
Mæður með ≥ 2					
TAP AFKVÆMA					
Fyrir got (hreiðrun mínus lifandi fæddir ungar)					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með ≥ 3					
Eftir got (lifandi fæddir ungar mínus lifandi á 13. degi eftir got)					
Kvendýr með 0					
Kvendýr með 1					
Kvendýr með 2					
Kvendýr með ≥ 3					

([1]) síðasti dagur pörunartímabilsins

B.65 *VITRO* MEMBRANE BARRIER TEST METHOD FOR SKIN CORROSION

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir (2015). Með húðætingu er átt við varanlega skemmd í húð, sem birtist sem sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á hana, samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]). Þessi prófunaraðferð, sem jafngildir uppfærðri OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir, er prófunaraðferð *í glasi* með tálma úr himnu sem hægt er að nota til að greina ætandi íðefni. Í prófunaraðferðinni er notuð gervihimna sem er hönnuð til að bregðast við ætandi íðefnum á svipaðan hátt og dýraskinn á staðnum.

2. Húðætandi eiginleikar hafa venjulega verið metnir með því að bera prófunaríðefnið á húð lifandi dýrs og meta þannig umfang vefjaskemmdanna eftir ákveðinn tíma (2. heimild). Auk núverandi prófunaraðferðar hafa nokkrar aðrar aðferðir við prófanir *í glasi* verið notaðar sem staðgöngukostir (3. og 4. heimild) fyrir staðlaða aðferð við prófun *í lífi* á kanínuhúð (Kafli B.4 í þessum viðauka, jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir), sem hægt er að nota til að greina ætandi íðefni (2. heimild). Í stigskiptri prófunar- og matsáætlunin fyrir mat og flokkun á húðætandi eiginleikum og leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) á húðertingu/-ætingu er mælt með notkun á fullgiltum og viðurkenndum aðferðum til prófana *í glasi* samkvæmt einingum 3 og 4 (1. og 5. heimild). Í leiðbeiningarskjalinu um samþættar aðferðir við prófun og mat er lýst nokkrum einingum sem samflokka upplýsingaveitur og greiningartæki, og i. veittar leiðbeiningar um hvernig skal samþætta og nota fyrirliggjandi prófunargögn og önnur gögn til að meta húðertingar- og húðætingarmátt íðefna, og ii. lagðar til nálganir þegar þörf er á frekari prófunum, þ.m.t. þegar niðurstöður reynast neikvæðar (5. heimild). Í þessari nálgun í einingum er hægt að nota jákvæðar niðurstöður úr aðferðum við prófanir *í glasi* til að flokka íðefni sem ætandi efni án þess að þörf sé á prófunum á dýrum og þannig er dregið úr notkun á dýrum og hún milduð og komist hjá sársauka og þjáningu sem kann að fylgja því ef dýr eru notuð í þessum tilgangi.

3. Fullgildingarrannsóknum hefur verið lokið fyrir líkan með tálma úr himnu *í glasi*, sem fæst á almennum markaði undir heitinu Corrositex® (6.–8. heimild), þar sem heildarnákvæmnin við að spá fyrir um húðætingu er 79% (128/163), næmi er 85% (76/89) og sértæki er 70% (52/74) fyrir gagnagrunn með 163 efnum og blöndum (7. heimild). Á grundvelli þessarar viðurkenndu fullgildingar er þessi fullgilta viðmiðunaraðferð ráðlögð til notkunar sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun til að meta húðætingarmátt íðefna (5. og 7. heimild). Áður en hægt er að nota líkan með tálma úr himnu *í glasi* fyrir húðætingu í eftirlitsskyni skal ákvarða áreiðanleika þess, gildi (nákvæmni) og takmarkanir vegna fyrirhugaðrar notkunar til að tryggja að það sé svipað fullgiltu viðmiðunaraðferðinni (9. heimild), í samræmi við fyrirframskilgreinda nothæfisstaðla (10. heimild). Gagnkvæma samþykkt gagna, samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfara-stofnunarinnar, er aðeins hægt að tryggja eftir að búið er að endurskoða og fella inn í jafngilda OECD-viðmiðunarreglu um prófanir allar tillagðar, nýjar eða uppfærðar aðferðir samkvæmt nothæfisstöðlunum. Sem stendur fellur aðeins ein aðferð *í glasi* undir OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir og þessi prófunaraðferð, líkanið sem fæst á almennum markaði undir heitinu Corrositex®.

4. Aðrar prófunaraðferðir fyrir húðætingu byggjast á notkun á endurgerðri mannshúð (OECD-viðmiðunarregla 431 um prófanir) (3. heimild) og einangraðri húð af rottum (OECD-viðmiðunarregla 430 um prófanir) (4. heimild). Í þessum viðmiðunarreglum um prófanir er einnig kveðið á um undirflokkun ætandi íðefna í þrjá undirflokka fyrir ætandi eiginleika í HSK SÞ og þrjá pökkunarflokka SÞ fyrir flutning vegna hættu af völdum ætandi eiginleika. Þessar viðmiðunarreglur um prófanir voru upphaflega samþykktar árið 2006 og uppfærðar árið 2015 til að vísa til leiðbeiningarskjalsins um samþættar aðferðir við prófun og mat (IATA) og uppfæra skrána yfir hæfnisefnin.

SKILGREININGAR

5. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í viðbætinum.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

6. Prófunin, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, gerir kleift að sanngreina ætandi prófunaríðefni og að undirflokka ætandi prófunaríðefni samkvæmt HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (tafla 1). Að auki er hægt að nota slíka prófunaraðferð til að taka ákvarðanir varðandi ætandi og óætandi eiginleika tiltekinna flokka íðefna, t.d. lífrænna og ólífrænna sýra, sýruafleiða ([2]) og sem grunn fyrir tilteknar prófanir á flutningi (7. og 11.–12. heimild). Í þessari

([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).

([2]) „Sýruafleiða“ er ósérhæft flokksheiti og er í meginatriðum skilgreint sem íðefni sem er framleitt úr sýru annað hvort beint eða með breytingum eða útskiptingu að hluta til. Þessi flokkur nær yfir anhýdríð, halógensýrur, sölt og aðrar gerðir íðefna.

prófunaraðferð er lýst almennri aðferð sem er svipuð og fullgilta viðmiðunarprófunaraðferðin (7. heimild). Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðertingu skal það tekið fram að prófunaraðferð B.46 (sem jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 439 um prófanir) varðar sérstaklega rannsókn *í glasi* á áhrifum húðertingar á heilbrigði (13. heimild). Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um samþættar aðferðir við prófun og mat (5. heimild).

Tafla 1

Undirflokkur og undirundirflokkar fyrir húðætingu í HSK SÞ (1)

Undirflokkur fyrir ætandi áhrif (1. Undirflokkur) (fyrir yfirvöld sem nota ekki undirundirflokka)	Mögulegir undirundirflokkar fyrir ætandi áhrif (1) (fyrir yfirvöld sem nota undirundirflokka, þ.m.t. reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun)	Ætandi áhrif á ≥ 1 af 3 dýrum	
		Váhrif	Athugun
Ætandi	Undirundirflokkur 1A fyrir ætandi áhrif	≤ 3 mínútur	≤ 1 klukkustund
	Undirundirflokkur 1B fyrir ætandi áhrif	> 3 mínútur /≤ 1 klukkustund	≤ 14 dagar
	Undirundirflokkur 1C fyrir ætandi áhrif	> 1 klukkustund /≤ 4 klukkustundir	≤ 14 dagar

(1) Að því er varðar ESB þá gildir reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun um undirundirflokkana þrjá fyrir húðætingu, 1A, 1B og 1C.

7. Sú takmörkun er á fullgiltu tilvísunaraðferðinni (7. heimild) að mörg óætandi íðefni og nokkur ætandi íðefni uppfylla e.t.v. ekki skilyrði fyrir prófun á grundvelli niðurstaðnanna úr upphaflegu samhæfisprófuninni (sjá 13. lið). Vatnskennd íðefni með pH-gildi á styrkbilinu 4,5 til 8,5 uppfylla oft ekki skilyrði fyrir prófun; þó voru 85% íðefna sem voru prófuð á þessu pH-styrkbili óætandi í prófunum á dýrum (7. heimild). Hægt er að nota aðferðina *í glasi* með tálma úr himnu til að prófa föst efni (leysanleg eða óleysanleg í vatni), vökva (vatnskenndir eða ekki vatnskenndir) og ýrulausnir. Prófunaríðefni sem valda ekki greinanlegum breytingum í samhæfisprófuninni (þ.e. litabreytingu í efnagreinikerfi fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðarinnar) er þó ekki hægt að prófa með aðferðinni með tálma úr himnu og skal gera prófanir á þeim með öðrum prófunaraðferðum.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

8. Prófunarkerfið samanstendur af tveimur þáttum: tilbúnum tálma úr líffræðilegum stórsameindum og efnagreinikerfi (CDS); með þessari prófunaraðferð eru greindar, fyrir milligöngu efnagreinikerfisins, skemmdir á tálmanum með himnunni af völdum ætandi prófunaríðefna eftir að prófunaríðefnið hefur verið sett á yfirborð tilbúna tálmans úr himnunni úr stórsameindum (7. heimild), sem gera má ráð fyrir að stafi af sömu ætingarvirkni og hefur áhrif á lifandi húð.

9. Gegnþrengingu himnutálma (eða gegndræpi) er hægt að mæla með margs konar aðferðum eða efnagreinikerfi, þ.m.t. breytingu á litarefni pH-litvísisleysilitar eða á öðrum eiginleikum litvísislausnarinnar undir tálmanum.

10. Ákvarða skal að tálminn úr himnu sé fullgiltur, þ.e. viðeigandi og áreiðanlegur, fyrir fyrirhugaða notkun. Í þessu felst að tryggja að samræmi sé í mismunandi efnablöndum að því er varðar eiginleika tálmans, t.d. geti viðhaldið tálma gagnvart óætandi íðefnum, og að hægt sé að flokka ætingareiginleika íðefnanna í samræmi við mismunandi undirundirflokka HSK SÞ fyrir ætandi eiginleika. Viðkomandi flokkun byggir á þeim tíma sem það tekur íðefni að þrengja sér í gegnum tálmann með himnunni yfir í litvísislausnina.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

11. Áður en aðferðin *í glasi* með tálma úr himnu, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnin tólf sem mælt er með í töflu 2. Ef efni á skránni fæst ekki, eða þegar slíkt er réttlætanlegt, má nota annað efni þar sem tiltæk eru fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* (t.d. af skránni yfir viðmiðunaríðefni (10. heimild)) að því tilskildu að sömu hæfiskröfum eins og lýst er í töflu 1 sé beitt.

Tafla 2

Hæfnisefni ([1])

Efni ([2])	CAS-númer	Íðefnaflokkur	Undirundirflokkur HSK SÞ *í lífi* ([3])	Undirundirflokkur HSK SÞ *í glasi* ([3])
Bórtríflúoríðdíhýdrat	13319-75-0	Ólífrænar sýrur	1A	1A
Saltpéturssýra	7697-37-2	Ólífrænar sýrur	1A	1A
Fosfórpentaklóríð	10 026-13-8	Forefni ólífrænna sýra	1A	1A
Valerýlklóríð	638-29-9	Sýruklóríð	1B	1B
Natríumhýdroxíð	1 310-73-2	Ólífrænir basar	1B	1B
1-(2-amínóetýl)píperasín	140-31-8	Alifatísk amín	1B	1B
Bensensúlfónýlklóríð	98-09-9	Sýruklóríð	1C	1C
N,N-dímetýlbensýlamín	103-83-3	Anilín	1C	1C
Tetraetýlenpentamín	112-57-2	Alifatísk amín	1C	1C
Evgenól	97-53-0	Fenól	NC	NC
Nónýlakrýlat	2 664-55-3	Akrýlöt/metakrýlöt	NC	NC
Natríumbíkarbónat	144-55-8	Ólífræn sölt	NC	NC

([1]) Efnin tólf, sem eru tilgreind hér að framan, innihalda þrjú efni úr hverjum af þeim þremur undirundirflokkum HSK SÞ fyrir ætandi efni og þrjú efni sem eru óætandi efni, sem greiður aðgangur er að hjá utanaðkomandi birgjum, og undirundirflokkur HSK SÞ byggir á niðurstöðum úr rannsóknum *í lífi* af háum gæðum. Þessi efni eru tekin af skránni yfir 40 viðmiðunarefni, sem eru í lágmarksskránni yfir íðefni sem eru tilgreind til að sýna fram á nákvæmni og áreiðanleika prófunaraðferðanna sem eru sambærilegar fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni að því er varðar byggingu og virkni, og voru valin úr þeim 163 viðmiðunaríðefnum sem voru upphaflega notuð til að fullgilda viðmiðunarprófunaraðferðina (Corrositex®) (7., 10. og 14. heimild). Markmiðið með þessu valferli var að ná yfir, að því marki sem unnt var, íðefni sem: voru dæmigerð fyrir svörunarsvið ætingar (t.d. óætandi, ætandi samkvæmt pökkunarflokkum SÞ I, II og III) sem fullgilta viðmiðunarprófunaraðferðin getur mælt eða spáð fyrir um; voru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem voru notaðir í fullgildingarferlinu; hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu; kölluðu fram endurtakanlegar niðurstöður í fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni; kölluðu fram endanlegar niðurstöður í viðmiðunarprófuninni *í lífi*; voru fáanleg á markaði; og fylgdi ekki óásættanlegur förgunarkostnaður (14. heimild).

([2]) Efnin prófuð óblönduð eða með 90% hreinleika.

([3]) Samsvarandi pökkunarflokkar SÞ eru I, II og III, eftir því sem við á, fyrir undirundirflokka 1A, 1B og 1C samkvæmt HSK SÞ. NC: óætandi.

VERKFERLI

12. Í eftirfarandi liðum er lýst þáttum og verkferli að því er varðar prófunaraðferð með tálma úr gervihimnu til að meta ætandi eiginleika (7. og 15. heimild), byggt á núverandi fullgiltri viðmiðunaraðferð þ.e. Corrositex®, sem fæst á almennum markaði. Himnutálmann og samhæfis-/litvísislausnir og flokkunarlausnir er hægt að búa til, tilreiða eða fá á almennum markaði, s.s. þegar um er að ræða fullgiltu viðmiðunaraðferðina Corrositex®. Aðferðarlýsing fyrir prófunaraðferð við sýnatöku fyrir fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðina er aðgengileg (7. heimild). Prófanir skulu fara fram við umhverfishita (17–25 °C) og þættirnir skulu uppfylla eftirfarandi skilyrði.

Samhæfisprófun fyrir prófunaríðefni

13. Áður en prófun með tálma úr himnu er framkvæmd skal gera samhæfisprófun til að ákvarða hvort unnt er að greina prófunaríðefnið með efnagreiningarkerfinu. Ef efnagreiningarkerfið greinir ekki prófunaríðefnið hentar prófunaraðferðin með tálma úr himnu ekki til að meta hugsanlega ætingareiginleika þess tiltekna prófunaríðefnis og nota skal aðra prófunaraðferð. Efnagreiningarkerfið og váhrifaaðstæður í samhæfisprófuninni skulu endurspegla váhrifin í síðari prófunum með tálma úr himnu.

Flokkaprófun með tímamörkum fyrir prófunaríðefni

14. Ef það á við um prófunaraðferðina skal prófunaríðefni, sem hefur verið samþykkt með samhæfisprófuninni, gangast undir flokkaprófun með tímamörkum, þ.e. skimunarprófun til að greina milli veikra og sterkra sýra eða basa. Í fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðinni er flokkunarprófun með tímamörkum t.d. notuð til að sýna hvor tímamörkin skal nota, byggt á því hvort umtalsverður sýru- eða basaforði greinist. Nota skal tvö mismunandi gegndræpitímamörk til að ákvarða ætandi eiginleika og undirundirflokka HSK SÞ fyrir húðætingu, sem byggja á sýru- eða basaforða prófunaríðefnisins.

ÞÆTTIR PRÓFUNARAÐFERÐAR MEÐ TÁLMA ÚR HIMNU

Tálmi úr himnu

15. Himnutálminn samanstendur af tveimur þáttum: prótínríku vatnskenndu hlaupi úr stórsameindum og gegndræpri stuðningshimnu. Prótínríka hlaupið skal vera ógegndræpt fyrir vökva og föst efni en það skal vera hægt að tæra það og gera gegndræpt. Tilbúinn himnutálma skal geyma við fyrir fram ákveðin skilyrði sem sýnt hefur verið fram á að komi í veg fyrir skemmdir á hlaupinu, t.d. þurrkun, vöxtur örvera, tilfærsla eða sprungumyndun, sem myndi draga úr nothæfi þess. Ákvarða skal viðunandi geymslutíma og ekki skal nota himnutálmana að þeim tíma loknum.

16. Gegndræpa stuðningshimnan veitir prótínríka hlaupinu stuðning meðan á hleypingu og váhrifum af völdum prófunaríðefnisins stendur. Stuðningshimnan skal koma í veg fyrir að hlaupið falli saman eða færist til og geta hleypt öllum prófunaríðefnunum í gegn.

17. Prótínríka hlaupið sem samanstendur af prótíni, t.d. hornefni, kollageni eða blöndum af prótíni, myndar efnivið úr hlaupi sem prófunaríðefninu er miðað að. Prótínríka efninu er komið fyrir á yfirborði stuðningshimnunnar og látið verða að hlaupi áður en himnutálminn er settur ofan á litvísislausnina. Prótínríka hlaupið skal allt vera jafnt að þykkt og þéttleika og engar loftbólur eða gallar skulu vera til staðar sem gætu haft áhrif á starfrænan heilleika þess.

Efnagreinikerfi (CDS)

18. Litvísislausnin, sem er sama lausn og notuð er fyrir samhæfisprófunina, á að sýna svörun við tilvist prófunaríðefnis. Nota skal pH-litvísisleysilit eða leysilitasamsetningu, t.d. kresólrauðan og metýlappelsínugulan, sem sýnir litabreytingar sem svörun við tilvist prófunaríðefnisins. Mælikerfið getur verið sjónrænt eða rafrænt.

19. Greinikerfi sem eru þróuð til að greina flutning prófunaríðefnis í gegnum himnutálmann skulu metin m.t.t. gildis og áreiðanleika, til að sýna fram á það svið íðefna sem hægt er að greina og magngreiningarmörkin.

FRAMKVÆMD PRÓFUNAR

Samsetning þátta prófunaraðferðarinnar

20. Tálmanum úr himnunni er komið fyrir í hettuglasi (eða röri) sem inniheldur litvísislausnina þannig að öll stuðningshimnan er í snertingu við litvísislausnina og engar loftbólur eru til staðar. Þess skal gætt að tryggja að heilleika tálmans sé viðhaldið.

Prófunaríðefni sett á

21. Hæfilegu magni af prófunaríðefninu, t.d. 500 µl af vökva eða 500 mg af fínt muldu föstu efni (7. heimild), er komið gætilega fyrir í lögum á efri hluta yfirborðs himnutálmans og því dreift jafnt. Viðeigandi fjöldi samhliða prófana, t.d. fjórar (7. heimild), er undirbúinn fyrir hvert prófunaríðefni og samsvarandi samanburði (sjá 23.–25. lið). Skrá skal tímann þegar prófunaríðefnið er sett á himnutálmann. Til að tryggja rétta skráningu á stuttum ætingartíma skal prófunaríðefnið sett á mismunandi tíma í hettuglösin með samhliða prófununum.

Mæling á gegnþrengingu himnutálma

22. Hvert hettuglas skal vaktað með viðeigandi hætti og skrá skal hvenær fyrsta breyting á litvísislausninni á sér stað, þ.e. gegnþrenging tálmans, og ákvarða tímann sem líður milli ísetningar og gegnþrengingar himnutálmans.

Samanburðir

23. Í prófunum þar sem notað er burðarefni eða leysir með prófunaríðefninu skal burðarefnið eða leysirinn vera samhæfð himnutálmakerfinu, þ.e. ekki breyta heilleika himnutálmakerfisins, og skal ekki breyta ætandi eiginleikum prófunaríðefnisins. Þegar við á skal prófa samanburðinn með leysi (eða burðarefni) samskeiða prófunaríðefninu til að sýna fram á samhæfi leysisins við himnutálmakerfið.

24. Prófa skal jákvæðan (ætandi) samanburð með ætandi virkni í meðallagi, t.d. 110 ± 15 mg natríumhýdroxíð (undirundirflokkur 1B í HSK SÞ fyrir ætandi efni) (7. heimild), samskeiða prófunaríðefninu til að meta hvort prófunarkerfið virkar með viðunandi hætti. Það kann að vera gagnlegt að prófa annan jákvæðan samanburð, sem er úr sama íðefnaflokki og prófunaríðefnið, til að meta hlutfallslegan ætingarmátt ætandi prófunaríðefnis. Velja skal jákvæða(n) samanburð(i) sem er(u) í meðallagi ætandi (t.d. undirundirflokkur 1B í HSK SÞ) til að greina breytingar á gegnþrengingartíma sem kann að vera óásættanlega mikið lengri eða styttri en sett viðmiðunargildi og gefur þannig vísbendingar um að prófunarkerfið virki ekki sem skyldi. Í þessum tilgangi koma mjög ætandi (undirundirflokkur 1A í HSK SÞ) eða óætandi íðefni að takmörkuðum notum. Ætandi íðefni í undirundirflokki 1B í HSK SÞ myndu gera kleift að greina gegndræpitíma sem er of hraður eða of hægur. Hægt væri að nota lítillega ætandi efni (undirundirflokkur 1C í HSK SÞ) sem jákvæðan samanburð til að mæla getu prófunaraðferðarinnar til að greina með samræmdum hætti milli lítillega ætandi og óætandi íðefna. Óháð því hvaða aðferð er notuð skal þróa viðunandi svörunarsvið fyrir jákvæðan samanburð á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna um gegndræpitíma fyrir jákvæða samanburðinn sem er notaður, s.s. meðaltal ± 2–3 staðalfrávik. Í hverri rannsókn skal ákvarða nákvæman gegndræpitíma fyrir jákvæða samanburðinn svo að hægt sé að greina frávik sem eru utan viðunandi sviðs.

25. Einnig skal prófa neikvæðan (óætandi) samanburð, t.d. 10% sítrónusýra, 6% própansýra (7. heimild), samskeiða prófunaríðefninu sem annars konar gæðaeftirlit til að sýna fram á starfrænan heilleika himnutálmans.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika rannsóknar

26. Samkvæmt settum tímamæliþáttum fyrir hvern undirundirflokk HSK SÞ fyrir ætandi eiginleika er tíminn (í mínútum), sem líður frá því að prófunaríðefnið er sett á himnutálmann og þar til gegnþrenging tálmans á sér stað, notaður til að spá fyrir um ætingareiginleika prófunaríðefnisins. Til að rannsókn geti talist viðunandi skal samskeiða jákvæði samanburðurinn sýna þann gegnþrengingartíma sem búist er við (t.d. 8–16 mínútna gegndræpitíma fyrir natríumhýdroxíð, ef það er notað sem jákvæður samanburður), skal samskeiða neikvæði samanburðurinn ekki vera ætandi, og skal samskeiða samanburður með leysi, ef hann er hafður með, hvorki vera ætandi né geta breytt ætingarmætti prófunaríðefnisins. Áður en aðferðin, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni hennar með því að nota efnin tólf sem ráðlögð eru í töflu 2. Nota skal fyrirframskilgreinda nothæfisstaðla fyrir nýjar hliðstæðar aðferðir, sem eru hannaðar samkvæmt þessari prófunaraðferð og samsvara fullgiltu viðmiðunaraðferðinni (14. heimild) hvað skipulag og virkni varðar, til að sýna fram á áreiðanleika og nákvæmni nýju aðferðarinnar áður en hún er notuð til prófana vegna eftirlits (10. heimild).

Túlkun niðurstaðna og ætingarflokkun fyrir prófunaríðefni

27. Tíminn (í mínútum) sem líður milli þess að prófunaríðefnið er sett á himnutálmann og gegnþrenging himnu á sér stað er notaður til að flokka prófunaríðefnið með tilliti til undirundirflokka HSK SÞ fyrir ætandi efni (1. heimild) og, ef við á, pökkunarflokks SÞ (16. heimild). Þröskuldstímagildi fyrir þessa þrjá undirundirflokka fyrir ætandi efni eru ákvörðuð fyrir hverja tillagða prófunaraðferð. Við endanlega ákvörðun varðandi þröskuldstímagildi skal taka tillit til þarfarinnar til að lágmarka vanflokkun að því er varðar hættu á ætingu (þ.e. röng, neikvæð niðurstaða). Í núverandi viðmiðunarreglum um prófanir skal nota þröskuldstímagildi Corrositex®, eins og lýst er í töflu 3, þar eð sú aðferð er sem stendur eina prófunaraðferðin sem fellur undir viðmiðunarreglurnar um prófanir (7. heimild).

Tafla 3

Spálíkan Corrositex®

Meðalgegndræpitími (mín.)		Spá HSK SÞ (3)
Prófunaríðefni í 1. Undirflokki (1) (ákvarðað með flokkunarprófun aðferðarinnar)	Prófunaríðefni í 2. Undirflokki (2) (ákvarðað með flokkunarprófun aðferðarinnar)	
0–3 mín.	0–3 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1A
> 3 til 60 mín.	> 3 til 30 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1B
> 60 til 240 mín.	> 30 til 60 mín.	Ætandi, valkvæður undirundirflokkur 1C
> 240 mín.	> 60 mín.	Óætandi

(1) Prófunaríðefni með mikinn sýru-/basaforða (6. heimild)
(2) Prófunaríðefni með litinn sýru-/basaforða (6. heimild)
(3) Undirundirflokkar 1A, 1B og 1C í HSK SÞ samsvara pökkunarflokkum SÞ I, II og III eftir því sem við á.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

28. Tíminn (í mínútum), sem líður milli þess að prófunaríðefnið og jákvæði samanburðurinn eru sett á og gegnþrenging himnu á sér stað, skal settur fram í töfluformi sem stök gögn úr samhliða prófun, sem og meðaltal ± staðalfrávik fyrir hverja prófun.

Prófunarskýrsla

29. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni og samanburðarefni:

— efni með einum efnisþætti: 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 blanda: lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér að framan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir,

— meðhöndlun prófunaríðefnisins/samanburðarefnisins fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt,

— geymsluskilyrði.

Ökutæki:

— auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,

— rök fyrir vali á burðarefni.

Líkan með tálma úr himnu í glasi og aðferðarlýsing sem notuð eru, þ.m.t. sönnuð nákvæmni og áreiðanleiki

Prófunaraðstæður:

— lýsing á tækinu og verklagsreglum við undirbúning sem notuð eru,

— uppruni og samsetning tálma úr himnu *í glasi* sem er notaður,

— samsetning og eiginleikar litvísislausnarinnar,

— aðferð við greiningu,

— magn prófunaríðefnis og samanburðarefnis,

— fjöldi samhliða prófana,

— lýsing á og rök fyrir flokkaprófun með tímamörkum,

— notkunaraðferð,

— athugunartími,

— lýsing á þeim matsviðmiðunum og flokkunarviðmiðunum sem eru notaðar,

— sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunaraðferðarinnar fyrir reglubundna notkun með prófunum á hæfnisefnunum.

Niðurstöður:

— töflusetning einstakra óunninna gagna úr einstökum prófunum og samanburðarsýnum fyrir hverja samhliða prófun,

— lýsingar á öðrum áhrifum sem fram komu,

— afleidd flokkun með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstöður

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) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/æting.

3) Kafli B.40a í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns (RhE)

4) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófunaraðferð við mælingar á rafviðnámi gegnum húð (TER)

5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

13) Kafli B.46 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðertingu: Prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Aðgengilegt á: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

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 (9. heimild).

Íðefni: Efni eða blanda.

Efnagreinikerfi (CDS): Sjónrænt eða rafrænt mælikerfi með litvísislausn sem sýnir svörun við tilvist prófunaríðefnis, t.d. með breytingu á pH-litvísisleysilit eða leysilitasamsetningu sem sýnir litabreytingu sem svörun við tilvist prófunaríðefnisins eða með annars konar efnafræðilegum eða rafefnafræðilegum viðbrögðum.

Samsvörun: Samsvörun er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er stundum notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. Samsvörun er að miklu leyti háð því hversu algeng jákvæð svörun er í þeim gerðum prófunaríðefna sem rannsakaðar eru (9. heimild).

HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á íðefnum): 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).

IATA: Samþættar aðferðir við prófun og mat (e. *Integrated Approach on Testing and Assessment*).

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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.

NC: Óætandi.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i. grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii. lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii. gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni sem eru svipuð þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (9. heimild).

Gildi: Lýsing á sambandi prófunaraðferðarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunaraðferðin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (9. 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 samanburðar-nákvæmni (9. 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 (9. heimild).

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

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 (9. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

B.66 GREINING *Í GLASI* MEÐ STÖÐUGRI, INNLEIDDRI AÐVIRKJUN TIL AÐ GREINA ESTRÓGENVIÐTAKAÖRVA OG -BLOKKA

ALMENNUR INNGANGUR

Viðmiðunarregla OECD um prófanir byggð á nothæfi

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 455 um prófanir (2016). Viðmiðunarregla 455 um prófanir er viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (PBTG) þar sem lýst er aðferðafræði greininga *í glasi* með stöðugri, innleiddri aðvirkjun (e. *transactivaton*) til að greina estrógenviðtakaörva og -blokka (ER TA-greiningar). Hún samanstendur af nokkrum prófunaraðferðum með samsvarandi verkunarmáta og virkni til greiningar á estrógenviðtakaörva og -blokka (þ.e. ERα, og/eða ERβ) og skal auðvelda þróun nýrra samsvarandi eða breyttra prófunaraðferða í samræmi við meginreglurnar um fullgildingu sem settar eru fram í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um fullgildingu og alþjóðlega staðfestingu á nýjum eða uppfærðum prófunaraðferðum fyrir hættumat (1. heimild). Fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðirnar (2. viðbætir og 3. viðbætir) sem leggja grunninn að þessari viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi eru:

   — STTA-greiningin (greining á aðvirkjun stöðugrar innleiðslu) (2. heimild) þar sem notuð er frumulínan (h) ERα-HeLa-9903 og

   — VM7Luc ER TA-greiningin (3. heimild) þar sem notuð er frumulínan VM7Luc4E2 (1) sem tjáir einkum hERα og að hluta hER (4. og 5. heimild).

   Nothæfisstaðlar (6. og 7. heimild) eru tiltækir fyrir þróun og fullgildingu samsvarandi greininga fyrir sömu endapunkta hættu og þá skal nota. Þeir gefa færi á tímanlegum breytingum á viðmiðunarreglu 455 um prófanir byggða á nothæfi þannig að hægt sé að bæta nýjum, samsvarandi greiningum við uppfærða viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi en þó verður samsvarandi greiningum einungis bætt við eftir endurskoðun og samþykki Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir því að nothæfisstaðlarnir séu uppfylltir. Unnt er að nota hverja sem er af greiningunum sem er að finna í viðmiðunarreglu 455 um prófanir til að uppfylla kröfur aðildarlanda um niðurstöður úr prófunum á aðvirkjun estrógenviðtaka og njóta um leið góðs af kerfi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir gagnkvæmt samþykki gagna.

Bakgrunnur og meginreglur greininganna sem falla undir þessa prófunaraðferð

2. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsaðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur fyrir prófanir og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum. Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum var endurskoðaður árið 2012. Upphaflega og endurskoðaða hugtakarammann er að finna sem viðauka í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um staðlaðar viðmiðunarreglur um prófanir til að meta íðefni með tilliti til innkirtlatruflandi eiginleika (8. heimild). Hugtakaramminn samanstendur af fimm stigum, hvert stig samsvarar mismunandi stigi líffræðilegs margbreytileika. ER TA-greiningarnar sem lýst er í þessari prófunaraðferð tilheyra 2. stigi sem felur í sér greiningar *í glasi* sem veita upplýsingar um valið eða valin gangvirki/valinn eða valda ferla innkirtlastarfsemi. Þessi prófunaraðferð er fyrir greiningar *í glasi* með aðvirkjun og er ætluð til að greina estrógenviðtakaörva og -blokka.

3. Víxlverkun estrógens við estrógenviðtaka (ER) getur haft áhrif á umritun estrógenstýrðra gena sem geta leitt til vakningar eða heftingar á frumuferlum, þ.m.t. þau sem eru nauðsynleg fyrir frumufjölgun, eðlilegan fósturþroska og æxlunarstarfsemi (9.–11. heimild). Truflun á eðlilegum estrógenvirkum kerfum getur e.t.v. komið af stað skaðlegum áhrifum á eðlilega þroskun (einstaklingsmyndun), frjósemisheilbrigði og heilleika æxlunarfæranna.

4. TA-greiningar *í glasi* byggjast á beinni eða óbeinni víxlverkun efnanna við tiltekinn viðtaka sem stýrir umritun vísigensafurðar. Slíkar greiningar hafa verið mikið notaðar til að meta genatjáningu sem er stýrt af tilteknum kjarnaviðtökum, s.s. estrógenviðtökum (12.–16. heimild). Lagt hefur verið til að þær séu notaðar við greiningu á aðvirkjun estrógens sem er stýrt af estrógenviðtakanum (ER) (17.–19. heimild). Að minnsta kosti tvær mikilvægar undirtegundir kjarnaestrógenviðtaka eru til staðar, α og β, sem eru kóðaðir með mismunandi genum. Viðkomandi prótín hafa mismunandi líffræðileg hlutverk sem og mismunandi dreifingu í vef og bindisækni bindils (20.–26. heimild). α-kjarnaestrógenviðtakar miðla hefðbundinni estrógensvörun (27.–30. heimild) og því eiga flest líkön sem verið er að þróa til að mæla estrógenviðtakavirkjun eða -heftingu sérstaklega við um ERα. Greiningarnar eru notaðar til að greina íðefni sem virkja (eða hefta) estrógenviðtaka í kjölfar bindingar bindils en eftir það binst viðtaka- og bindilsflókinn tilteknum DNA-

svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen sem leiðir til aukinnar frumutjáningar merkiprótíns. Hægt er að nota mismunandi svörun vísigena í þessum greiningum. Í kerfum sem byggjast á lúsíferasa umbreytir lúsíferasaensímið lúsíferasahvarf-efninu í lífljómunarafurð sem hægt er að mæla megindlega með ljósmæli. Önnur dæmi um algenga viðtaka eru flúrljómunarprótín og LacZ-genið sem kóðar β-galaktósíðasa, ensím sem getur umbreytt litlausa hvarfefninu X-gal (5- brómó-4-klóró-indólýl-galaktópýranósíð) í bláa afurð sem hægt er að magngreina með litrófsmæli. Hægt er að meta þessa viðtaka á fljótan og ódýran hátt með prófunarsettum sem fást á almennum markaði.

5. Sýnt hefur verið fram á mikilvægi og áreiðanleika STTA- og VM7Luc TA-greininga fyrir ætlaðan tilgang þeirra með fullgildingarrannsóknum (3., 4., 5. og 30. heimild). Nothæfisstaðla fyrir ljómunarmiðaðar ER TA-greiningar þar sem notaðar eru brjóstafrumulínur er að finna í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild). Þessum nothæfisstöðlum hefur verið breytt til að hægt sé að nota þá fyrir bæði STTA- og VM7Luc TA-greiningar (2. heimild).

6. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

Gildissvið og takmarkanir í tengslum við TA-greiningar

7. Lagt er til að þessar greiningar séu notaðar við skimun og forgangsröðun en þær geta einnig veitt upplýsingar um gangvirki sem hægt er að nota við greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þær greina aðvirkjun af völdum efnafræðilegrar bindingar við estrógenviðtaka með prófun *í glasi*. Niðurstöðurnar skal því ekki yfirfæra beint á flókin boð og stýringu óskaddaðs innkirtlakerfisins í lífi.

8. Aðvirkjun miðlað með estrógenviðtaka telst eitt af helstu gangvirkjum innkirtlatruflunar (IT) þó að það séu önnur gangvirki sem geta framkallað innkirtlatruflun, þ.m.t. i. víxlverkun við aðra viðtaka og ensímkerfi innan innkirtlakerfisins, ii. hormónamyndun, iii. efnaskiptavirkjun og/eða -óvirkjun hormóna, iv. dreifing hormóna í markvefjum, og v. úthreinsun úr líkamanum. Engin greininganna í þessari prófunaraðferð varðar þá verkunarhætti.

9. Þessi prófunaraðferð varðar getu íðefnanna til að virkja (þ.e. virka sem örvar) og einnig til að bæla niður (þ.e. virka sem blokkar) ER-háða umritun. Sum íðefni geta, háð frumugerð, sýnt virkni bæði sem örvar og blokkar og eru þekkt sem efni sem hafa valbundin áhrif á estrógenviðtaka (e. *selective estrogen receptor modulators* (SERM)). Íðefni sem eru neikvæð í þessum greiningum mætti meta með ER-bindigreiningu áður en sú ályktun er dregin að íðefnið bindist ekki viðtakanum. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumukerfa *í glasi* eru greiningarnar að auki eingöngu líklegar til að upplýsa um virkni móðursameindarinnar. Að teknu tilliti til þess að einungis stök efni voru notuð í fullgildingunni hefur ekki verið fjallað um nothæfið fyrir prófunarblöndur. Fræðilega séð telst prófunaraðferðin samt sem áður nothæf til prófunar á fjölþáttaefnum, UVCB-efnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á fjölþáttaefni, UVCB-efni eða blöndu er notuð til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni 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.

10. Niðurstöður örvaprófunar fyrir þau 34 efni sem voru prófuð í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru gefnar upp í töflu 1 í upplýsingaskyni. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar *í glasi* fyrir ER-bindingu og TA og/eða greininguna á legörvandi áhrifum, eru 26 af þessum efnum flokkuð sem afdráttarlausir ER-blokkar og 8 neikvæð (2., 3., 18., 31.–34. heimild). Niðurstöður blokkaprófunar fyrir þau 15 efni sem voru prófuð í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru gefnar upp í töflu 2. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar *í glasi* fyrir ER-bindingu og TA og/eða greininguna á legörvun, eru 4 af þessum efnum flokkuð sem afdráttarlausir/álitnir ER-blokkar og 10 neikvæð (2., 3., 18. og 31. heimild). Að því er varðar gögnin sem eru tekin saman í töflu 1 og töflu 2 var 100% samkvæmni milli viðmiðunarprófunaraðferðanna tveggja í flokkun allra efnanna með blokkagreiningu, fyrir utan eitt (Mifepristone), og hvert efni var rétt flokkað sem ER-örvar/blokkar eða neikvætt. Viðbótarupplýsingar um þennan flokk íðefna, sem og um fleiri íðefni sem voru prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum í fullgildingarrannsóknunum, koma fram í nothæfisstöðlunum fyrir ER TA-greininguna (6. og 7. heimild) í 2. viðbæti (töflur 1, 2 og 3).

Tafla 1

Yfirlit yfir niðurstöður úr STTA- og VM7Luc ER TA-greiningum fyrir efni sem eru prófuð í báðum greiningum á örvum og flokkuð sem ER-örvar (POS) eða neikvæð (NEG)

	Efni	CAS-númer	STTA-greining (1)			VM7Luc ER TA-greining (2)		Gagnagjafi fyrir flokkun (4)		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi (b) (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi (b), (3) (M)	Aðrar ER TA-greiningar (c)	ER-binding	Legörvandi
1	17ß-estradíól (a)	50-28-2	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradíól (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etínýlestradíól (a)	57-63-6	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbólon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestósterón (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kúmýlfenól (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-tert-oktýlfenól (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apígenín (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT

	Efni	CAS-númer	STTA-greining (1)			VM7Luc ER TA-greining (2)		Gagnagjafi fyrir flokkun (4)		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi (b) (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi (b), (3) (M)	Aðrar ER TA-greiningar (c)	ER-binding	Legörvandi
9	Atrasín (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenól A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS(65/65)	POS	POS
11	Bisfenól B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Bútýlbensýlþalat (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG
13	Kortikósterón (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Kúmestról (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daídsein (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Díetýlstilbóestról (a)	56-53-1	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Etýlparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(án PC50)	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estrón (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS

	Efni	CAS-númer	STTA-greining (1)			VM7Luc ER TA-greining (2)		Gagnagjafi fyrir flokkun (4)		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi (b) (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi (b), (3) (M)	Aðrar ER TA-greiningar (c)	ER-binding	Legörvandi
21	Halóperídól	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kampferól (a)	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Kepón (a)	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketókónasól	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Línúrón (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	mesó-Hexestról (a)	84-16-2	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metýltestósterón (a)	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Mórín	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Nóretýnódrel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	p,p’-Metoxýklór (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(án PC50) (b)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenóbarbítal (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT

	Efni	CAS-númer	STTA-greining (1)			VM7Luc ER TA-greining (2)		Gagnagjafi fyrir flokkun (4)		
			ER TA-virkni	PC10-gildi (M)	PC50-gildi (b) (M)	ER TA-virkni	EC50-gildi (b), (3) (M)	Aðrar ER TA-greiningar (c)	ER-binding	Legörvandi
32	Reserpín	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spírónólaktón (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testósterón	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni; M = mól; EC50 = hálfur hámarkshrifstyrkur prófunarefnis; NEG = neikvætt; POS = jákvætt; NT = ekki prófað (e. *Not tested*); PC10 (og PC_{50}) = styrkur prófunarefnis þar sem svörunin er 10% (eða 50% fyrir PC50) af svöruninni sem jákvæði samanburðurinn framkallar (E2 1nM) í hverjum bakka.

(a) Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tafla 4-1 (3)).

(b) Hámarksstyrkur prófaður án takmarkana vegna frumueiturhrifa eða óuppleysanleika var 1 × 10-5 M (STTA-greining) og 1 × 10-3 M (VM7Luc ER TA-greining).

(c) Fjöldi innan sviga stendur fyrir prófunarniðurstöður sem flokkast sem jákvæðar (POS) eða neikvæðar (NEG) af heildarfjölda rannsóknanna sem vísað er til.

(1) Gildi tilkynnt í *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2. heimild).

(2) Matsskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“ (3. heimild)

(3) Meðalgildi EC50 voru reiknuð út frá gildum skráðum af rannsóknarstofunum í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi).

(4) Flokkun sem ER-örvi eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölunum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða á prófunaraðferðum (ICCVAM-nefndin) á prófunaraðferðum vegna ER-bindingar og aðvirkjunar (TA) (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18., 31., 33. og 34. heimild).Athugasemdir: Ekki hafa allar greiningar í þessari prófunaraðferð sömu mælingar. Í sumum tilvikum er ekki hægt að reikna út EC50 þar sem ekki kemur fram svörunarferill fyrir fullan skammt. Í STTA-greiningunni er PC10-gildið helsta mælingin en það kunna einnig að vera fleiri dæmi þar sem PCx veitir gagnlegar upplýsingar.

Tafla 2

Samanburður á niðurstöðum úr STTA- og VM7Luc ER TA-greiningum fyrir efni sem eru prófuð í báðum blokkagreiningum og flokkuð sem ER-blokkar (POS) eða neikvæð (NEG)

	Efni ([a])	CAS-númer	ER STTA-greining ([1])		VM7Luc ER TA-greining ([2])		Væntanleg áhrif ER STTA ([4])	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um ([5])	MeSH-íðefnaflokkur ([6])	Vöruflokkur ([7])
			ER TA-virkni	IC_{50}-gildi ([b]) (M)	ER TA-virkni	IC_{50}-gildi ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hýdroxýtamoxífen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
2	Díbensó[a,h]antrasen	53-70-3	POS	Án IC_{50}	POS	Án IC_{50}	POS	PP	Fjölhringa efnasamband	Rannsóknar-stofuíðefni, náttúruvara
3	Mífepristón	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	POS, vægt	NEG	Steri	Lyf
4	Raloxífen vetnisklóríð	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
5	Tamoxífen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
6	17β-estradíól	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
7	Apígenín	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heturhringliða samband	Leysilitur, náttúruvara, lyfjamilliefni

	Efni (a)	CAS-númer	ER STTA-greining (1)		VM7Luc ER TA-greining (2)		Væntanleg áhrif ER STTA (4)	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um (5)	MeSH-íðefnaflokkur (6)	Vöruflokkur (7)
			ER TA-virkni	IC_{50}-gildi (b) (M)	ER TA-virkni	IC_{50}-gildi (b), (3) (M)				
8	Atrasín	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
9	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Estri, þalsýra	Innihaldsefni í snyrtivörum, iðnefni, mýkiefni
10	Fenarímól	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ekki prófað	PN	Heturhringliða samband, pýrimídín	Sveppaeyðir
11	Flavón	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
12	Flútamíð	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amíð	Lyf, efni til dýralækninga
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
14	p-n-nónýlfenól	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ekki prófað	NEG	Fenól	Milliefni

	Efni ([a])	CAS-númer	ER STTA-greining ([1])		VM7Luc ER TA-greining ([2])		Væntanleg áhrif ER STTA ([4])	ICCVAM-flokkun sem sammæli er um ([5])	MeSH-íðefnaflokkur ([6])	Vöruflokkur ([7])
			ER TA-virkni	IC_{50}-gildi ([b]) (M)	ER TA-virkni	IC_{50}-gildi ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratról	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Vetniskolefni (hringað)	Náttúruvara

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni; M = mól; IC50 = hálfur hámarksheftistyrkur prófunaríðefnis; NEG = neikvætt, PN = álitið neikvætt; POS = jákvætt; PP = álitið jákvætt.

([a]) Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (2. og 3. heimild).

([b]) Hámarksstyrkur prófaður án takmarkana vegna frumueiturhrifa eða óuppleysanleiki var 1 × 10-3 M (STTA-greining) og 1 × 10-5 M (VM7Luc ER TA-greining).

([1]) Fullgildingarskýrslan fyrir „Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity“, B-hluti

([2]) Matsskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“ (3. heimild).

([3]) Meðaltal IC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.

([4]) ER STTA-virkni sem gert er ráð fyrir út frá skráðum áhrifum í rannsóknarsögulegu gögnunum um ER-viðtakagreiningu í CERI-greiningunni, greiningunni á legörvandi áhrifum og upplýsingum sem er samraðað úr aðgengilegum heimildum (2. heimild).

([5]) Flokkun sem ER-blokki eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á greiningum á ER-bindingu og TA-greiningum (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18. og 31. heimild).

([6]) Efnunum var skipað í einn eða fleiri íðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnabanka U.S. National Library of Medicine’s Hazardous Substances (aðgengilegt á: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR

Grundvallarþættir greiningar

11. Þessi prófunaraðferð gildir um greiningar þar sem notaður er ERα-viðtaki sem er stöðugt innleiddur eða er innrænn og stöðugt innleidd vísigensmíð sem er stjórnað af einum eða fleiri estrógensvörunarþáttum; aðrir viðtakar s.s. ERβ kunna þó að vera til staðar. Þetta eru grundvallarþættir greiningar.

Samanburður

12. Lýsa skal grundvellinum fyrir tillögðum samskeiða viðmiðunarstöðlum fyrir hverja greiningu á örvum og blokkum. Samskeiða samanburður (neikvæður, með leysi og jákvæður), eins og við á, skal gefa vísbendingu um að greiningin sé virk við prófunarskilyrðin og er grundvöllur fyrir samanburði á tilraunum; hann er yfirleitt hluti af viðmiðununum fyrir ásættanleika vegna viðkomandi tilraunar (1. heimild).

Staðlað verklag við gæðaeftirlit

13. Staðlað verklag við gæðaeftirlit skal vera eins og lýst er fyrir hverja greiningu til að tryggja að frumulínan haldist stöðug í gegnum margar umsáningar, helst laus við berfryminga (þ.e. laus við bakteríusmit) og halda getunni til að veita hina tilætluðu ER-miðluðu svörun til lengri tíma. Hafa skal frekara eftirlit með frumulínum að því er varðar rétt kenni og að því er varðar önnur aðskotaefni (t.d. sveppir, gersveppir og veirur).

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu

14. Áður en óþekkt íðefni eru prófuð með einhverri af greiningunum í þessari prófunaraðferð skal hver rannsóknarstofa sýna fram á hæfni við notkun greiningarinnar. Til að sýna fram á hæfni skal hver rannsóknarstofa prófa hæfnisefnin 14 sem tilgreind eru í töflu 3 fyrir greiningu á örva og 10 hæfnisefni í töflu 4 fyrir greiningu á blokka. Þessi hæfnisprófun mun einnig staðfesta svörunargetu prófunarkerfisins. Skráin yfir hæfnisefnin er undirmengi viðmiðunarefnanna sem eru tilgreind í nothæfisstöðlunum fyrir ER TA-greiningarnar (6. heimild). Þessi efni fást á almennum markaði, eru úr þeim flokkum íðefna sem eru almennt tengdir ER-blokkunar- og örvunarvirkni, sýna viðeigandi máttarsvið fyrir þann styrk sem búist var við ER-örva/blokka (þ.e. mikinn yfir í lítinn) og ná yfir neikvæð efni. Prófun á hæfnisefnunum skal endurtaka a.m.k. tvisvar á mismunandi dögum. Sýnt er fram á hæfni með réttri flokkun (jákvætt/neikvætt) á hverju hæfnisefni. Hver tæknimaður skal endurtaka hæfnisprófun þegar hann lærir á greiningarnar. Sum þessara hæfnisefna geta, háð frumugerð, hagað sér eins og efni sem hafa valbundin áhrif á estrógenviðtaka (SERM) og sýnt virkni sem bæði örvar og blokkar. Hæfnisefnin eru þó flokkuð í töflum 3 og 4 eftir þekktri ráðandi virkni sem skal notuð við hæfnismatið.

15. Til að sýna fram á nothæfi og m.t.t. gæðaeftirlits skal hver rannsóknarstofa taka saman rannsóknarsögulega gagnagrunna fyrir örva og blokka með viðmiðunarstöðlum (t.d. 17β-estradíóli og tamoxífeni), jákvæð og neikvæð samanburðaríðefni og samanburð með leysi (t.d. DMSO). Í upphafi skal gagnagrunnurinn myndaður úr a.m.k. 10 sjálfstæðum keyrslum með örva (t.d. 17β-estradíól) og 10 sjálfstæðum keyrslum með blokka (t.d. tamoxífen). Niðurstöðum úr greiningum í framtíðinni á þessum viðmiðunarstöðlum og samanburðum með leysi skal bætt við til að stækka gagnagrunninn og tryggja þannig samræmi og nothæfi lífgreiningarinnar á rannsóknarstofunni til lengri tíma.

Tafla 3

Skrá yfir (14) hæfnisefni fyrir greiningu á örva ([8])

Nr. ([7])	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við ([1])	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH-íðefnaflokkur ([5])	Völuflokkur ([6])
				PC10-gildi (M) ([2])	PC50-gildi (M) ([2])	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) ([3])	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) ([4])		
14	Díetýlstilbóestról	56-53-1	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10\text{-}14 – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Vetniskolefni (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
12	17α-estradíól	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
15	mesó-Hexestról	84-16-2	POS	$<1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
11	4-tert-oktýlfenól	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenól	Milliefni
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
6	Bisfenól A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenól	Milliefni

Nr. (7)	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við (1)	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH-íðefnaflokkur (5)	Vöruflokkur (6)
				PC10-gildi (M) (2)	PC50-gildi (M) (2)	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) (3)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) (4)		
2	Kampferól	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara
3	Bútýlbensýlþalat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboxýlsýra, estri, þalsýra	Mýkiefni, iðnefni
4	p,p’- metoxýklór	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Vetniskolefni (halógenað)	Varnarefni, efni til dýralækninga
1	Etýlparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboxýlsýra, fenól	Lyf, rotvarnarefni
17	Atrasín	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
20	Spírónólaktón	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktón, steri	Lyf

Nr. (7)	Efni	CAS-númer	Svörun sem búist er við (1)	STTA-greining			VM7Luc ER TA-greining		MeSH-íðefnaflokkur (5)	Vöruflokkur (6)
				PC10-gildi (M) (2)	PC50-gildi (M) (2)	Styrkbil prófunar (M)	VM7Luc EC50-gildi (M) (3)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) (4)		
21	Ketókónasól	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heturhringliða samband	Lyf
22	Reserpín	50-55-5	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heturhringliða samband, indól	Lyf, efni til dýralækninga

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni; EC50 = hálfur hámarkshrifstyrkur prófunarefnis; NEG = neikvætt; POS = jákvætt; PC10 (og PC50) = styrkur prófunarefnis þar sem svörunin er 10% (eða 50% fyrir PC50) af svöruninni sem jákvæði samanburðurinn framkallar (E2 1nM) í hverjum bakka.

(1) Flokkun í jákvætt eða neikvætt vegna ER-örvavirkni var byggð á bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á ER-bindingu og TA-greiningum (31. heimild) sem og á gögnum sem byggð eru á athugunum og öðrum upplýsingum úr birtum og ryndum rannsóknum sem vísað er til eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18., 31., 32., 33. og 34. heimild).

(2) Gildi tilkynnt í *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30. heimild).

(3) Meðaltal EC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.

(4) Tilgreindir styrkleikar voru hæstu styrkleikar sem voru prófaðir (ákvörðun á styrkbili) við fullgildingu VM7Luc ER TA-greiningarinnar. Ef styrkleikar voru mismunandi milli rannsóknarstofanna eru hæstu styrkleikarnir tilgreindir. Sjá töflu 4–10 í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild).

(5) Efnunum var skipað í einn eða fleiri íðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnagrunn U.S. National Library of Medicine’s Hazardous Substances Database (aðgengilegt á: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

(7) Í töflu 1 (skrá yfir viðmiðunaríðefni (22) fyrir mat á nákvæmni ER-örva) í nothæfisstöðlunum (6. heimild).

(8) Ef hæfnisefni fæst ekki lengur á almennum markaði er hægt að nota efni með sömu flokkun og er sambærilegt að því er varðar mátt, verkunarhátt og íðefnaflokk.

Tafla 4

Skrá yfir (10) hæfnisefni fyrir greiningu á blokka

	Efni ([a])	CAS-númer	ER STTA-greining ([1])			VM7Luc ER TA-greining ([2])			Væntanleg áhrif ER STTA ([1])	Samþykkt flokkun ICCVAM ([5])	MeSH-íðefnaflokkur ([6])	Vöruflokkur ([7])
			ER TA-virkni	IC_{50} (M)	Styrkbil prófunar (M)	ER TA-virkni	IC_{50} ([3]) (M)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) ([4])				
1	4-hýdroxýtamoxí-fen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
2	Raloxífen vetnisklóríð	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	POS, í meðallagi	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
3	Tamoxífen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Vetniskolefni (hringað)	Lyf
4	17β-estradíól	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	séu neikvæð (*)	PN	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
5	Apígenín	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heturhringliða samband	Leysilitur, náttúruvara, lyfjamilliefni
6	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Estri, þalsýra	Innihaldsefni í snyrtivörum, iðnefni, mýkiefni

	Efni ([a])	CAS-númer	ER STTA-greining ([1])			VM7Luc ER TA-greining ([2])			Væntanleg áhrif ER STTA ([1])	Samþykkt flokkun ICCVAM ([5])	MeSH-íðefnaflokkur ([6])	Vöruflokkur ([7])
			ER TA-virkni	IC_{50} (M)	Styrkbil prófunar (M)	ER TA-virkni	IC_{50} ([3]) (M)	Hæsti styrkur við ákvörðun á styrkbili (M) ([4])				
7	Flavón	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	séu neikvæð (*)	PN	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	séu neikvæð (*)	NEG	Flavonóíð, heturhringliða samband	Náttúruvara, lyf
9	p-n-nónýlfenól	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ekki prófað	NEG	Fenól	Milliefni
10	Resveratról	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	séu neikvæð (*)	NEG	Vetniskolefni (hringað)	Náttúruvara

Skammstafanir: CAS-númer = skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni; M = mól; IC50 = hálfur hámarksheftistyrkur prófunaríðefnis; NEG = neikvætt, PN = álitið neikvætt; POS = jákvætt.

(*) Flokkað sem neikvætt samkvæmt fræðilegri samantekt (2. heimild).

([a]) Algeng efni prófuð í STTA- og VM7Luc ER TA-greiningunum sem voru tiltekin sem estrógenörvar eða neikvæð og notuð til að meta nákvæmni í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (2. og 3. heimild).

([1]) Fullgildingarskýrslan fyrir „Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity“, B-hluti

([2]) Matsskýrsla ICCVAM-nefndarinnar um LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3. heimild).

([3]) Meðaltal IC50-gilda voru reiknuð út frá gildum sem rannsóknarstofurnar í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni (XDS, ECVAM og Hiyoshi) skráðu.

([4]) Tilgreindir styrkleikar voru hæstu styrkleikar sem voru prófaðir (ákvörðun á styrkbili) við fullgildingu VM7Luc ER TA-greiningarinnar. Ef styrkleikar voru mismunandi milli rannsóknarstofanna eru hæstu styrkleikarnir tilgreindir. Sjá töflu 4-11 í matsskýrslu ICCVAM-nefndarinnar „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3. heimild).

([5]) Flokkun sem ER-blokki eða ekki var byggð á upplýsingum í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar ICCVAM-nefndarinnar á prófunaraðferðum vegna ER-bindingar og aðvirkjunar (TA) (31. heimild) sem og á upplýsingum úr ritum sem eru birt og rýnd eftir að bakgrunnsskjöl ICCVAM-nefndarinnar vegna endurskoðunarinnar voru tilbúin (2., 3., 18. og 31. heimild).

([6]) Efnunum var skipað í einn eða fleiri íðefnaflokka með því að nota alþjóðlega viðurkennt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Efnunum var skipað í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnabanka U.S. National Library of Medicine’s Hazardous Substances (aðgengilegt á: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

Viðmiðanir fyrir ásættanleika prófunarkeyrslu

16. Samþykki eða höfnun prófunarkeyrslu byggir á matinu á niðurstöðunum sem fást með þeim viðmiðunarstöðlum og samanburði sem notaðir eru fyrir hverja tilraun. PC50- (EC50-) eða IC50-gildin fyrir viðmiðunarstaðlana skulu uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika sem kveðið er á um fyrir völdu greininguna (fyrir STTA, sjá 2. viðbæti, fyrir VM7Luc ER TA, sjá 3. viðbæti) og allir jákvæðir/neikvæðir samanburðir skulu flokkast rétt í hverri samþykktri tilraun. Sýna skal fram á getu til að framkvæma greininguna með samræmdum hætti með því að þróa og viðhalda rannsóknarsögulegum gagnagrunni fyrir viðmiðunarstaðlana og samanburðinn (sjá 15. lið). Nota má staðalfrávik eða frávikssvið meðaltala ferilaðlögunarstika staðalkúrfa fyrir viðmiðunarstaðla úr mörgum tilraunum sem mælikvarða á samanburðarsamkvæmni innan rannsóknarstofa. Að auki skal uppfylla eftirfarandi meginreglur varðandi viðmiðanir fyrir ásættanleika:

— Gögnin skulu vera nægileg fyrir megindlegt mat á ER-virkjun (fyrir greiningu á örva) eða ER-bælingu (fyrir greiningu á blokkum) (þ.e. verkun og máttur).

— Til að tryggja nægilegt næmi skal meðalvirkni vísigens fyrir viðmiðunarstyrk viðmiðunarestrógens vera a.m.k. lágmarkið sem er tilgreint í greiningunum, í samanburði við samanburðinn með leysi (burðarefni). Fyrir STTA- og VM7Luc ER TA-greiningarnar er þetta fjórum sinnum meðaltal samanburðarins með leysi í hverjum bakka.

— Styrkleikarnir sem eru prófaðir skulu vera innan leysnisviðs prófunaríðefnisins og skulu ekki sýna frumueiturhrif.

Greining gagna

17. Nota skal skilgreindu aðferðina við túlkun gagna fyrir hverja greiningu við flokkun á jákvæðri og neikvæðri svörun.

18. Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (16. liður) eru uppfylltar bendir það til þess að greiningin vinni á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin prófunarkeyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta vísbendingin um að nákvæm gögn hafi fengist. Ef tvær keyrslur gefa samanburðarnákvæmar niðurstöður (t.d. ef báðar niðurstöður prófunarkeyrslnanna benda til þess að prófunaríðefnið sé jákvætt) er ekki þörf á að framkvæma þriðju keyrslu.

19. Ef tvær keyrslur gefa ekki samanburðarnákvæmar niðurstöður (t.d. ef prófunaríðefnið er jákvætt í einni keyrslu og neikvætt í annarri), eða ef krafist er aukinnar vissu að því er varðar útkomu þessarar greiningar, skal framkvæma a.m.k. þrjár sjálfstæðar keyrslur. Í slíku tilviki byggist flokkunin á tveimur samsvarandi niðurstöðum af þremur.

Almennar viðmiðanir um túlkun gagna

20. Sem stendur er ekki til nein aðferð sem ríkir einhugur um til að túlka ER TA-gögn. Þó skal bæði eigindlegt (t.d. jákvætt/neikvætt) og/eða megindlegt (t.d. EC50, PC50, IC50) mat á ER-miðlaðri virkni byggja á gögnum sem byggð eru á athugunum og traustu vísindalegu mati. Jákvæðar niðurstöður skulu, ef unnt er, einkennast af bæði umfangi áhrifanna samanborið við samanburðinn með leysi (burðarefni) eða viðmiðunarestrógen og styrkleikans þegar áhrifin eiga sér stað (t.d. EC50, PC50, RPCMax, IC50, o.s.frv.).

Prófunarskýrsla

21. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Greining:

— greining sem er notuð,

— samanburður/viðmiðunarstaðall/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 ræktunarætinu 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 og burðarefni:

— lýsing á eiginleikum (eðli, birgir og lota),

— rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þekkt.

Frumur:

— gerð og uppruni frumna:

- er tjáning estrógenviðtaka (ER) innræn? Ef ekki, hvaða viðtaki (viðtakar) voru innleiddir?
- Vísigensmíð sem eru notuð (þ.m.t. upprunategundir),
- innleiðsluaðferð,
- aðferð við frumuval til að viðhalda stöðugri innleiðslu (eftir því sem við á),
- er innleiðsluaðferðin viðeigandi fyrir stöðugar línur?

— fjöldi umsáninga (frá afþíðingu),

— umsáningartala frumna við afþíðingu,

— aðferðir til að viðhalda frumuræktum.

Prófunarskilyrði:

— takmarkanir á leysni,

— lýsing á aðferðunum sem notaðar eru við mat á lífvænleika,

— samsetning ræktunarætis og styrkur koltvísýrings,

— styrkleikar prófunaríðefnis,

— rúmmál burðarefnis og prófunaríðefnis sem er bætt við,

— viðstöðuhitastig og -raki,

— lengd meðhöndlunar,

— frumuþéttleiki í upphafi meðhöndlunar og meðan á henni stendur,

— jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar,

— vísigenaprófefni (heiti vöru, birgir og lota),

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður prófunarkeyrslna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar,

Ásættanleikaathugun:

— margfeldi vakningar fyrir hvern greiningarbakka og hvort þeir nái lágmarkinu sem er krafist í greiningunni, byggðu á rannsóknarsögulegum gögnum um samanburði,

— raungildi fyrir viðmiðanir fyrir ásættanleika, t.d. log10EC50, log10PC50, logIC50 og Hill-hallagildi, fyrir samskeiða jákvæða samanburði/viðmiðunarstaðla.

Niðurstöður:

— óunnin og stöðluð gögn,

— hámarksgildi margfeldi vakningar,

— gögn um frumueiturhrif,

— lægsti hrifstyrkur (LEC), ef hann er fyrir hendi,

— gildi RPCMax, PCMax, PC50, IC50 og/eða EC50, eins og við á,

— tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef til eru, ásamt mælingu á skekkju og öryggi (t.d. staðalskekkja meðaltals, staðalfrávik, frávíksstuðlar eða 95% öryggisbil) og lýsing á því hvernig þessi gildi voru fengin.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Ályktun

HEIMILDIR

1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

4) Pujol P. et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): bls. 5367–73.

5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): bls. 67–82.

6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: bls. 20–6.

10) Welboren W.J. et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): bls. 1073–89.

11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): bls. 63–6.

12) Jefferson W.N., et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): bls. 179–189.

13) Sonneveld E. et al. (2006). Comparison of In Vitro and In Vivo Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, Toxicol. Sci., 89(1): bls. 173–187.

14) Takeyoshi M. et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): bls. 91–98.

15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of In Vitro and In Vivo Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals, 28(1): bls. 81–118.

16) Escande A. et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): bls. 1459–69.

17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, Toxicol. Lett, 102-103, 677-680.

18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): bls. 379–383.

21) Ogawa S. et al. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ER In Vivo and In Vitro, Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): bls. 122–126.

22) Enmark E. et al. (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): bls. 4258–4265.

23) Ball L.J. et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): bls. 204–211.

24) Barkhem T. et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): bls. 105–12.

25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): bls. 1703–1714.

26) Harris D.M. et al. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): bls. 558–568.

27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): bls. 1460–1468.

28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): bls. 515–522.

29) Gorski J. et al. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: bls. 45–80.

30) Jensen E.V. et al. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): bls. 547–569.

31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

32) Kanno J. et al. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for In Vivo Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

33) Kanno J. et al. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

34) Kanno J. et al. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

35) Geisinger et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

36) Baldwin et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

37) Li, Y. et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, In Vitro & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

1. viðbætir

SKILGREININGAR OG SKAMMSTAFANIR

Viðmiðanir fyrir ásættanleika: Lágmarksstaðlar fyrir nothæfi tilraunasamanburða og viðmiðunarstaðla. Allar viðmiðanir fyrir ásættanleika skulu uppfylltar til að tilraun teljist gild.

Nákvæmni (samsvörun): Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktum viðmiðunargildum niðurstöður úr greiningu eru. Þetta er mælikvarði á nothæfi greiningar og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra útkoma úr greiningu (1. heimild).

Örvi: Efni sem kallar fram svörun, t.d. umritun, þegar það binst tilteknum viðtaka.

Blokki: Gerð viðtakabindils eða íðefnis sem sjálft vekur enga líffræðilega svörun við bindingu við viðtaka en hindrar eða dregur úr svörunum sem er miðlað með örva.

Andestrógenlík virkni: Geta íðefnis til að bæla virkni 17β-estradíóls sem er miðlað með estrógenviðtökum.

Formgerð frumna: Form og útlit frumna sem ræktaðar eru í einlagi í einni holu vefjaræktunarbakka. Frumur sem eru að deyja sýna oft afbrigðilega formgerð.

CF: Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi efnum (e. *The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters*).

Meðhöndlun með viðarkolum/dextrani: Meðhöndlun með sermi notað í frumurækt. Meðhöndlun með viðarkolum/dextrani (oftast nefnd „strípun“) fjarlægir innræn hormón og hormónabindandi prótín.

Íðefni: Efni eða blanda.

Frumueiturhrif: Skaðleg áhrif á byggingu eða starfsemi frumu sem hafa að lokum í för með sér dauða hennar og geta endurspeglast í fækkun í fjölda frumna í holunni í lok váhrifatímabilsins eða dregið úr getu til að meta frumuvirkni þegar borið er saman við samskeiða samanburð með burðarefni.

FS: Fráviksstuðull.

DCC-FBS: Nautgripafósturssermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum.

DMEM: Eagle-æti með Dulbecco-breytingu

DMSO: Dímetýlsúlfoxíð.

E2: 17β-estradíól.

EC50: Hálfur hámarkshrifstyrkur prófunaríðefnis.

IT: Innkirtlatruflun.

hERα: Alfa-estrógenviðtaki úr mönnum.

hERß: Beta-estrógenviðtaki úr mönnum.

EFM: Æti án estrógens (e. *Estrogen-free medium*). Eagle-æti með Dulbecco-breytingu (DMEM) með viðbættu 4,5% nautgripafósturssermi meðhöndluðu með dextranhúðuðum viðarkolum, 1,9% L-glútamíni og 0,9% Pen-Strep.

ER: Estrógenviðtaki

ERE: Estrógensvörunarþáttur

Estrógenlík virkni: Geta efnis til að herma eftir 17β-estradíóli að því er varðar hæfni þess til að bindast og virkja estrógenviðtaka. Hægt er að greina estrógenlíka virkni sem er miðlað um hERα með þessari prófunaraðferð.

ERTA: Aðvirkjun estrógenviðtaka.

FBS: Nautgripafósturssermi.

HeLa: Ódauðleg leghálsfrumulína úr konu.

HeLa9903: Undirklón HeLa-frumu með stöðugt innleidd hERα og lúsíferasavísigen.

IC50: Hálfur hámarkshrifstyrkur heftandi prófunaríðefnis.

ICCVAM: Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM-nefndin).

Samanburðarnákvæmni milli stofa: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu efnum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og megindlega samsvarandi. Samanburðarnákvæmni milli stofa, einnig kölluð fjölsetrasamanburðarnákvæmni, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja greiningu með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (1. heimild).

Samanburðarnákvæmni innan stofu: Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að fá sömu niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð „einseturssamanburðarnákvæmni“ (1. heimild).

LEC: Minnsti hrifstyrkur (e. *lowest effective concentration*) er minnsti styrkur prófunaríðefnis sem kallar fram svörun (þ.e. minnsti styrkur prófunaríðefnisins sem veldur tölfræðilegum mun á margfeldisaukningu vakningar miðað við samskeiða burðarefnissamanburðinn).

Hliðstæð prófun (e. *Me-too test*): Heiti úr talmáli á greiningu sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“.

MT: Metallóþíónín.

MMTV: Æxlisveira í mjólkurkirtlum músa (e. *Mouse Mammary Tumor Virus*).

OHT: 4-hýdroxýtamoxífen.

PBTG: Viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (e. *Performance-Based Test Guideline*).

PC (jákvæður samanburður): Mjög virkt efni, helst 17ß-estradíól, sem er í öllum prófunum til að stuðla að eðlilegri virkni greiningarinnar.

PC10: Sá styrkur prófunaríðefnis sem veldur því að mæld virkni í greiningu á örva er 10% af hámarksvirkninni sem PC framkallar (E2 í 1 nM fyrir STTA-greininguna) í hverjum bakka.

PC50: Sá styrkur prófunaríðefnis sem veldur því að mæld virkni í greiningu á örva er 50% af hámarksvirkninni sem PC framkallar (E2 í viðmiðunarstyrknum sem tilgreindur er í prófunaraðferðinni) í hverjum bakka.

PCMax: Sá styrkur prófunaríðefnis sem framkallar RPCMax.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri greiningu, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar greiningar sem er samsvarandi fullgiltu greiningunni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru 1) grundvallarþættir greiningarinnar, 2) lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og 3) gildin fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu greiningunni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (1. heimild).

Hæfnisefni: Hlutmengi viðmiðunarefnanna í nothæfisstöðlunum sem rannsóknarstofur geta notað til að sýna fram á tæknilega færni með staðlaðri prófunaraðferð. Valviðmiðanir að því er varðar þessi efni fela að jafnaði í sér að þau séu dæmigerð fyrir svörunarsviðið, séu fáanleg á markaði og að með þeim séu tiltæk hágæða tilvísunargögn.

Hæfni: Sú geta sem sýnt er fram á til að framkvæma greiningu á tilhlýðilegan hátt fyrir prófun á óþekktum efnum.

Viðmiðunarestrógen (jákvæður samanburður, PC): 17β-estradíól (E2, CAS 50-28-2).

Viðmiðunarstaðall: Viðmiðunarefni sem er notað til að sýna fram á að greiningin sé fullnægjandi. 17β-estradíól er viðmiðunarstaðallinn fyrir STTA- og VM7Luc ER TA-greiningar.

Viðmiðunarprófunaraðferðir: Greiningarnar sem viðmiðunarregla 445 um prófanir byggð á nothæfi byggir á.

Gildi: Lýsing á sambandi greiningar og áhrifanna sem miðað er við og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki greiningin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) greiningar (1. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma greiningu með samanburðarnákvæmni innan og milli mismunandi rannsóknarstofa yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Hann er metinn með því að reikna út samanburðarnákvæmni innan stofu og milli stofa.

RLU: Hlutfallslegar ljóseiningar (e. *relative Light Units*).

RNA: Ríbósakjarnsýra.

RPCMax: Hámarksgildi svörunar sem prófunaríðefni framkallar, sett fram sem hundraðshluti svörunar sem 1 nM af E2 framkallar á sama bakka.

RPMI: RPMI 1640-æti með viðbættu 0,9% Pen-Strep og 8,0% nautgripafósturssermi (FBS).

Keyrsla: Stök tilraun til að meta efnafræðilega verkun á líffræðilega útkomu greiningarinnar. Hver keyrsla er heil tilraun sem er framkvæmd á samhliða sýni úr holum með frumum úr sama frumusafni eru sem settar í á sama tíma.

Óháð keyrsla: Aðskilin, óháð tilraun sem metur efnafræðilega verkun á líffræðilega útkomu greiningarinnar með notkun á frumum úr öðru frumusafni og nýlega þynntum íðefnum, framkvæmd á mismunandi dögum eða á sama degi af mismunandi starfsfólki.

SD: Staðalfrávik.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra efna sem eru rétt flokkuð með greiningunni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni greiningar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi greiningar (1. heimild).

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra efna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni greiningar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi greiningar (1. heimild).

Stöðug innleiðsla: Þegar DNA er innleitt í ræktaðar frumur á þann hátt að það samþættist og verður stöðugt í genamengi frumnanna sem leiðir af sér stöðuga tjáningu innleiddra gena. Klónar frumna með stöðuga innleiðslu eru valdir úr með merkiefni sem sýnir stöðugleikann (t.d. þol gegn G418).

STTA-greining: Greining á aðvirkjun stöðugrar innleiðslu, (e. *stably transfected transactivation Assay*) greiningin á umritunarvirkjun ERα í HeLa 9903 frumulínunni.

Rannsókn: Allt svið tilraunavinnunnar til að meta stakt, tiltekið efni með tiltekinni greiningu. Rannsókn samanstendur af öllum þrepum, þ.m.t. þynning á prófunarefni í prófunarmiðlinum, forprófunarkeyrslur til að ákvarða styrkleikasvið, allar nauðsynlegar ítarlegar keyrslur, gagnagreining, gæðatrygging, mat á frumueiturhrifum o.s.frv. Að rannsókn lokinni er hægt að flokka virkni prófunaríðefnisins á eiturhrifamarkið (þ.e. virkt, óvirkt eða ekki afgerandi) sem er metið með greiningunni sem er notuð og mat á mætti í tengslum við jákvæða viðmiðunaríðefnið.

Efni: Samkvæmt efnareglureglugerðinni ([1]) er efni skilgreint sem frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess og öll óhreinindi sem stafa frá vinnslunni en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess. Mjög svipuð skilgreining er notuð í tengslum við HSK SÞ (1. heimild).

Aðvirkjun (e. *transactivation*, TA): Gangsetning mRNA-nýsmíði sem svörun við tilteknu efnafræðilegu merki, s.s. bindingu estrógens við estrógenviðtakann.

Greining: Í tengslum við þessa prófunaraðferð er greining ein af aðferðunum sem er samþykkt sem fullgild vegna uppfyllingar útlistaðra nothæfisviðmiðana. Þættir greiningar fela til dæmis í sér þá tilteknu frumulínu með tilheyrandi vaxtarskilyrðum, tiltekið æti sem prófunin er framkvæmd í, skipulag við uppsetningu bakka, fyrirkomulag og þynningu prófunaríðefnis ásamt öllum öðrum æskilegum ráðstöfum að því er varðar gæðaeftirlit og tengdum gagnamatsþrepum.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Umritun: mRNA-nýsmíði.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni.

Fullgilt prófunaraðferð: Greining 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 ásættanleg fyrir fyrirhugaðan tilgang (1. heimild).

Fullgilding: Ferlið sem staðfestir áreiðanleika og gildi tiltekinnar nálgunar, aðferðar, greiningar, verklags eða mats í skilgreindum tilgangi.

Samanburður með burðarefni (e. *vehicle control*, VC): Leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefni og samanburðaríðefni er prófaður eingöngu sem burðarefni án uppleysta íðefnisins.

VM7: Kirtilkrabbameinsfruma sem hefur verið gerð ódauðleg og tjáir estrógenviðtaka innrænt.

VM7Luc4E2: Frumulínan VM7Luc4E2 var fengin úr VM7 kirtilkrabbameinsfrumum manns sem hafa verið gerðar ódauðlegar og tjá innrænt bæði lögun estrógenviðtakans (ERα og ERβ) og eru með stöðuga innleiðslu plasmíðsins pGudLuc7.ERE. Þetta plasmíð inniheldur fjögur eintök af tilbúnu fákirni sem inniheldur estrógensvörunarþáttinn sem er framan við MMTV-stýrilinn og lúsíferasagenið úr eldflugum.

Veikur jákvæður samanburður: Veikt virkt efni, valið af skránni yfir viðmiðunaríðefni, sem er í öllum prófunum til að tryggja eðlilega virkni greiningarinnar.

([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. viðbætir

GREINING Á AÐVIRKJUN STÖÐUGT INNLEIDDS ALFA-ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM MEÐ NOTKUN HERA-HELA-9903 FRUMULÍNUNNAR TIL AÐ GREINA VIRKNI ÍÐEFNA SEM ESTRÓGENÖRVAR OG -BLOKKAR

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu með aðvirkjun (TA) er notuð hERα-HeLa-9903 frumulínan til að greina estrógenörvavirkni sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hERα). Með fullgildingarrannsókninni á greiningunni á aðvirkjun stöðugrar innleiðslu (STTA) á vegum Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) í Japan, þar sem notuð var hERα-HeLa 9903 frumulínan til að greina virkni estrógenörva og -blokka sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hERα), er sýnt fram á gildi og áreiðanleika greiningarinnar í fyrirhuguðum tilgangi (1. heimild).

2. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hERα-miðlaða aðvirkjun (TA) með mælingu á efnaljómun sem endapunkt. Þó hafa verið skráð ljómunarmerki sem er ekki miðlað með viðtaka við plöntuestrógenstyrk sem er yfir 1 µM vegna ofvirkjunar á lúsíferasavísigeninu (2. og 3. heimild). Þó að skammtasvörunarferill gefi til kynna að raunvirkjun ER-kerfisins eigi sér stað við lægri styrk þarf að rannsaka gaumgæfilega, í ER TA-greiningarkerfum með innleiðslu sem er stöðug (1. viðbætir), tjáningu lúsíferasa sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða svipaðra efnasambanda sem grunur leikur á um að valdi plöntuestrógenlíkri ofvirkjun lúsíferasavísigens.

3. Lesa skal liðina „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir koma fram í viðbæti 2.1.

MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

4. Greiningin er notuð til að merkja bindingu estrógenviðtakans við bindil. Að lokinni bindilsbindingu yfirfærist viðtaka- og bindilsflókinn yfir í kjarnann þar sem hann binst tilteknum DNA-svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen lúsíferasa úr eldflugum sem leiðir til aukinnar frumutjáningar á lúsíferasaensími. Lúsíferín er hvarfefni sem lúsíferasaensímið umbreytir í lífljómunarafurð sem hægt er að mæla megindlega með ljósmæli. Hægt er að meta lúsíferasavirkni á fljótan og ódýran hátt með fjölda prófunarsetta sem fást á almennum markaði.

5. Í prófunarkerfinu er notuð hERα-HeLa-9903 frumulínan sem er fengin úr leghálsæxli úr konu með tveimur smíðum sem eru stöðug innskot: i. hERα-tjáningarsmíðið (sem kóðar fulla lengd viðtakans í mönnum) og ii. lúsíferasavísigensmíð úr eldflugum sem er með fimm raðendurtekningar á vítellógenín-estrógensvörunarþætti (ERE) og keyrðar af TATA-þætti músametallóþíónínstýrils (MT). Komið hefur í ljós að genasmíðin með TATA-þætti músametallóþíónínstýrils gefur bestan árangur og er því yfirleitt notuð. Með þessari hERα-HeLa-9903 frumulínu er því hægt að mæla getu prófunaríðefnis til að kalla fram hERα-miðlaða aðvirkjun lúsíferasagenatjáningar.

6. Að því er varðar greiningu á ER-örva er túlkun gagna byggð á því hvort hámarkssvörunarstig sem prófunaríðefni kallar fram sé eða sé ekki jafnt eða hærra en svörun örva sem samsvarar 10% af því sem framkallast að hámarki með (1 nM) styrk jákvæða samanburðarins (PC) 17β-estradíóli (E2) (þ.e. PC10). Þegar um er að ræða greiningu á ER-blokkum er túlkun gagna byggð á því hvort svörunin sýni eða sýni ekki a.m.k. 30% lækkun í virkni miðað við þá svörun sem íbótarsamanburðarsýnið (25 pM af E2) kallar fram án frumueiturhrifa. Fjallað er ítarlega um greiningu gagna og túlkun í lið 34–48.

VERKFERLI

Frumulínur

7. Í greiningunni skal nota HeLa-9903 frumulínuna með stöðugt innleiddan hERα. Hægt er að fá frumulínuna hjá frumusafninu Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)1, gegn undirritun samnings um yfirfærslu efnis (e. *Material Transfer Agreement* (MTA)).

8. Eingöngu skal nota frumur við prófunina sem eru lausar við berfryminga. Víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR) er ákjósanleg aðferð fyrir næma greiningu á berfrymingasýkingu (4.–6. heimild).

Stöðugleiki frumulínunnar

9. Til að vakta stöðugleika frumulínunnar skal nota E2, 17α-estradíól, 17α-metýltestósterón og kortikósterón sem viðmiðunarstaðla fyrir greiningu á örva og mæla skal heilan styrksvörunarferil þeirra prófunarstyrkbila sem eru gefin upp í töflu 1 a.m.k. einu sinni í hvert skipti sem greiningin er framkvæmd og niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við niðurstöðurnar sem er að finna í töflu 1.

10. Að því er varðar greiningu á blokkum skal mæla tvo heila styrkferla samtímis hverri keyrslu fyrir tvo viðmiðunarstaðla, tamoxífen og flútamíð. Vaktað skal að eigindleg flokkun þessara tveggja íðefna sem jákvætt eða neikvætt sé rétt.

Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka

11. Frumum skal viðhaldið í lágmarksæti Eagles (EMEM-æti) án fenólrauðs, að viðbættum 60 mg/l af sýkladrepandi kanamýsíni og 10% nautgripafóstursermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum (DCC-FBS), í CO2-ræktunarkassa (5% CO2) við 37±1 °C. Þegar 75–90% samrennsli er náð geta frumurnar farið í undirrækt í 10 ml af 0,4 x 105 – 1 x 105 frumur/ml fyrir 100 á frumuræktarskál. Frumurnar skulu leystar upp með 10% FBS-EMEM-æti (sem er það sama og EMEM-æti með DCC-FBS) og síðan settar í holur á örbakka með þéttleika sem nemur 1 x 104 frumur/(100 µl x hola). Næst skulu frumurnar látnar standa í 5% CO2-ræktunarkassa við 37°±1 °C í 3 klukkustundir áður en þær eru látnar verða fyrir váhrifum af íðefninu. Plastbúnaðurinn skal vera laus við estrógenvirkni.

12. Til að viðhalda heilleika svörunarinnar skal rækta frumurnar lengur en eina umsáningu úr frysta stofninum í skilyrta ætinu og skulu ekki ræktaðar lengur en 40 umsáningar. Að því er varðar hERα-HeLa-9903 frumulínuna er þetta minna en þrír mánuðir. Þó getur dregið úr nothæfi frumnanna ef þær eru ræktaðar við óviðeigandi ræktunarskilyrði.

13. Hægt er að tilreiða DCC-FBS eins og lýst er í viðbæti 2.2, eða fá það á almennum markaði.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar fyrir greiningu á ER-örva

14. Fyrir rannsóknina og meðan á henni stendur skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins með viðeigandi styrkleika af sterku estrógeni: E2, veikt estrógen (17α-estradíól), mjög veikur örvi (17α-metýltestósterón) og neikvætt efni (kortikósterón). Ásættanleg bil gilda fengin úr fullgildingarrannsókninni (1. heimild) eru tilgreind í töflu 1. Þessir fjórir samskeiða viðmiðunarstaðlar skulu hafðir með í hverri tilraun og niðurstöðurnar skulu vera innan hinna tilteknu ásættanlegu marka. Ef þetta er ekki gert skal ákvarða ástæðurnar fyrir því að viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru ekki uppfylltar (t.d. meðhöndlun frumna, og gæði og styrkur sermis og sýklalyfja) og endurtaka greininguna. Þegar

(1) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812

viðmiðununum fyrir ásættanleika hefur verið náð er samræmd notkun efniviðar fyrir frumuræktun nauðsynleg til að tryggja lágmarksbreytileika EC50-, PC50- og PC10-gilda. Þessir fjórir samskeiða viðmiðunarstaðlar sem skulu hafðir með í hverri tilraun (sem er framkvæmd við sömu skilyrði þ.m.t. efniviður, endursáningarþrep frumna og tæknimenn) geta tryggt næmi greiningarinnar vegna þess að PC10-gildin í hinum þremur jákvæðu viðmiðunarstöðlum skulu vera innan tiltekins ásættanlegs sviðs og það sama á við um PC50- og EC50-gildin þegar unnt er að reikna þau út (sjá töflu 1).

Tafla 1

Ásættanleg bil gilda fyrir viðmiðunarstaðlana fjóra fyrir greininguna á ER-örva

Heiti	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hill-hallagildi	Bil í prófun
17β-estradíól (E2) CAS-númer: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradíól CAS-númer: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikósterón CAS-númer: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metýltestósterón CAS-nr: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Jákvæðir og neikvæðir viðmiðunarstaðlar fyrir greiningu á ER-blokkum

15. Fyrir rannsóknina og meðan á henni stendur skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins með viðeigandi styrkleika jákvæða efnisins (tamoxífen) og neikvæða efnisins (flútamíð). Ásættanleg bil gilda fengin úr fullgildingarrannsókninni (1. heimild) eru tilgreind í töflu 2 Þessir tveir samskeiða viðmiðunarstaðlar skulu hafðir með í hverri tilraun og niðurstöðurnar skulu metnar með réttum hætti eins og sýnt er í viðmiðuninni. Ef þetta er ekki gert skal ákvarða ástæðurnar fyrir því að viðmiðanirnar eru ekki uppfylltar (t.d. meðhöndlun frumna, og gæði og styrkur sermis og sýklalyfja) og endurtaka greininguna. Að auki skal reikna út IC50-gildi fyrir jákvætt efni (tamoxífen) og niðurstöðurnar skulu vera innan hinna tilteknu ásættanlegu marka. Þegar viðmiðununum fyrir ásættanleika hefur verið náð er samræmd notkun efniviðar fyrir frumuræktun nauðsynleg til að tryggja lágmarksbreytileika IC50-gilda. Þessir tveir samskeiða viðmiðunarstaðlar sem skulu hafðir með í hverri tilraun (sem er framkvæmd við sömu skilyrði, þ.m.t. efniviður, endursáningarþrep frumna og tæknimenn) geta tryggt næmi greiningarinnar (sjá töflu 2).

Tafla 2

Viðmiðanir og ásættanleg bil gilda fyrir viðmiðunarstaðlana tvo fyrir greininguna á ER-blokkum

Heiti	Viðmiðanir	LogIC50	Bil í prófun
Tamoxífen CAS-númer: 10540-29-1	Jákvætt: reikna skal út IC50	-5,942 ~ -7,596	10-10 ~ 10-5 M
Flútamíð CAS-númer: 13311-84-7	Neikvætt: ekki skal reikna skal út IC30	—	10-10 ~ 10-5 M

Jákvæður samanburður og samanburður með burðarefni

16. Prófa skal jákvæða samanburðinn (PC) fyrir greiningu á ER-örva (1 nM af E2) og fyrir greiningu á ER-blokkum (10µM TAM) í a.m.k. þremur settum í hverjum bakka. Burðarefnið sem er notað til að leysa upp prófunaríðefni skal prófað sem samanburður með burðarefni (VC) í a.m.k. þremur settum í hverjum bakka. Ef notað er öðruvísi burðarefni í jákvæða samanburðinum en prófunaríðefnið skal til viðbótar við þetta bætt við prófun með öðrum samanburði með burðarefni en í a.m.k. þremur settum á sama bakka með jákvæða samanburðinum.

Gæðaviðmiðanir fyrir greiningu á ER-örva

17. Meðaltal lúsíferasavirkni fyrir jákvæða samanburðinn (1 nM E2) skal vera a.m.k. fjórfalt meðaltalið af samanburðinum með burðarefni (VC) á hverjum bakka. Þessi viðmiðun er fastsett á grundvelli áreiðanleika gildanna fyrir endapunktana úr fullgildingarrannsókninni (sögulega á milli fjór- og þrjátíufalt).

18. Að því er varðar gæðaeftirlitið með greiningunni skal margfeldi vakningarinnar sem samsvarar PC10-gildi samskeiða jákvæða samanburðarins (PC) (1 nM E2) vera meira en 1+2 staðalfrávik (SD) margfeldisgildis vakningarinnar (=1) fyrir samskeiða samanburðinn með burðarefni (VC). Í þágu forgangsröðunar getur PC10-gildið verið gagnlegt til einfalda nauðsynlega gagnagreiningu í samanburði við tölfræðilega greiningu. Þó að tölfræðileg greining veiti upplýsingar um mikilvægi er slík greining ekki megindleg breyta að því er varðar mátt sem byggist á styrk og er því ekki eins gagnleg hvað forgangsröðun varðar.

Gæðaviðmiðanir fyrir greiningu á ER-blokka

19. Meðaltal lúsíferasavirkni fyrir íbótarsamanburðarsýnið (25 nM E2) skal vera a.m.k. fjórfalt meðaltalið af samanburðinum með burðarefni (VC) á hverjum bakka. Þessi viðmiðun er fastsett á grundvelli áreiðanleika gildanna fyrir endapunktana úr fullgildingarrannsókninni.

20. Að því er varðar gæðaeftirlit með greiningunni skal hlutfallsleg umritunarvirkjun (e. *relative transcriptional activation*, RTA) á 1 nM E2 vera yfir 100%, RTA á 1µM 4-hýdroxýtamoxífeni (OHT) skal vera undir 40,6% og RTA á 100 µM digitónín (Dig) vera undir 0%.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð).

Burðarefni

21. Sem samskeiða samanburð með burðarefni (VC) skal nota dímetýlsúlfoxíð, eða viðeigandi leysi, í sama styrkleika og er notaður fyrir hina mismunandi jákvæðu og neikvæðu samanburði og prófunaríðefnin. Uppleysing prófunaríðefna skal vera í leysi sem leysir upp viðkomandi prófunaríðefni og getur blandast frumuætinu. Vatn, etanól (95–100% hreinleiki) og dímetýlsúlfoxíð eru hentug burðarefni. Ef notað er dímetýlsúlfoxíð skal magnið ekki fara yfir 0,1% (rúmmálshlutfall). Sýna skal fram á fyrir öll burðarefni að hámarksrúmmálið sem er notað sé ekki frumueitrandi og að það trufli ekki nothæfi greiningarinnar.

Tilreiðsla prófunaríðefna

22. Almennt skulu prófunaríðefnin leyst upp í dímetýlsúlfoxíði eða öðrum hentugum leysi og þau raðþynnt með sama leysinum í almenna hlutfallinu 1:10 til að undirbúa lausnir fyrir þynningu með ætinu.

Leysni og frumueiturhrif: atriði sem þarf að hafa í huga varðandi ákvörðun á skammtastærð

23. Framkvæma skal forprófun til að ákvarða viðeigandi styrkbil íðefnisins sem á að prófa og til að ganga úr skugga um hvort vandi að því er varðar leysni og frumueiturhrif fylgi prófunaríðefninu. Í upphafi eru íðefnin prófuð upp að hámarksstyrknum sem nemur 1 µl/ml, 1 mg/ml eða 1 mM, eftir því hver þeirra er lægstur. Fyrsta endanlega keyrslan, byggð á því hversu mikil frumueiturhrif eða skortur á leysni koma fram í forprófuninni, skal prófa íðefnið við log-röð þynninga sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM, 100µM, 10µM, o.s.frv.) og veita skal því athygli hvort vart verður við grugg, botnfall eða frumueiturhrif. Styrkleikar í annarri og, ef þörf krefur, þriðju keyrslu skulu aðlagaðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar og forðast styrkleika sem eru óleysanlegir eða framkalla mikil frumueiturhrif.

24. Að því er varðar ER-örva og -blokka getur aukinn styrkur frumueiturhrifa valdið verulegum breytingum á eða fjarlægt hefðbundna sigmoid-svörun og skal hafa það í huga við túlkun gagnanna. Nota skal prófunaraðferðir fyrir frumueiturhrif, sem geta veitt upplýsingar varðandi 80% lífvænleika frumna, með viðeigandi greiningu sem byggir á rannsóknarstofureynslu.

25. Ef niðurstöðurnar úr frumueiturhrifaprófuninni sýna að styrkleiki prófunaríðefnisins hefur dregið úr frumufjölda um 20% eða meira skal sá styrkur teljast frumueitrandi og styrkleikar við og yfir frumueitrandi styrknum ekki hafðir með í matinu.

Váhrif af íðefni og skipulagning greiningarbakka

26. Framkvæmd við aðferðina við þynningu íðefnis (1. og 2. þrep) og váhrif á frumur (3. þrep) er hægt að hafa sem hér segir:

1. þrep: Hvert prófunaríðefni skal raðþynnt í dímetýlsúlfoxíði (DMSO), eða viðeigandi leysi, og bætt í holurnar á míkrótítrunarbakka til að ná fram endanlegum raðbundnum styrkleikum sem voru ákvarðaðir með forprófuninni á skammtastærðum (einkum í röðum af t.d. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, og 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) fyrir prófanir í þremur settum.

2. þrep: Þynning íðefnis: Fyrst er þynntur 1,5 µl af prófunaríðefninu í leysinum upp að rúmmálinu 500 µl af æti.

3. þrep: Váhrif af íðefni á frumurnar: Bætið 50 µl af þynningu með æti (undirbúningur skv. 2. þrepi) í greiningarholu sem inniheldur 10^4 frumur/100 µl/holu.

Ráðlagt endanlegt magn nauðsynlegs ætis fyrir hverja holu er 150 µl. Prófunarsýnum og viðmiðunarstöðlum má skipta niður eins og sýnt er í töflu 3 og töflu 4.

Tafla 3

Dæmi um skiptingu viðmiðunarstaðlanna eftir styrkleika í greiningarbakkanum við greiningu á ER-örva

Röð	17α-metýltestósterón			Kortikósterón			17α-estradíól			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	styrkur 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	styrkur 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	styrkur 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	styrkur 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	styrkur 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	styrkur 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	styrkur 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2)

27. Viðmiðunarstaðlarnir (E2, 17α-estradíól, 17α-metýltestósterón og kortikósterón) skulu prófaðir í hverri keyrslu (tafla 3). PC-holur meðhöndlaðar með 1 nM af E2 sem getur kallað fram hámarksvakningu og E2 og VC-holur meðhöndlaðar eingöngu með dímetýlsúlfoxíði (eða viðeigandi leysi) skulu hafðar með á hverjum prófunarbakka greiningarinnar (tafla 4). Ef frumur af mismunandi uppruna (t.d. mismunandi umsáningartala, mismunandi lotur o.s.frv.) eru notaðar í sömu tilraun skal prófa viðmiðunarstaðlana fyrir hvern frumugjafa.

Tafla 4

Dæmi um skiptingu á styrkleika á prófunar- og samanburðaríðefnum í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-örva

Röð	Prófunaríðefni 1			Prófunaríðefni 2			Prófunaríðefni 3			Prófunaríðefni 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	styrkur 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	styrkur 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	styrkur 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	styrkur 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	styrkur 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	styrkur 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	styrkur 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2)

Tafla 5

Dæmi um skiptingu á styrkleika viðmiðunarstaðlanna í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-blokkum

Röð	Tamoxífen			Flútamíð			Prófunaríðefni 1			Prófunaríðefni 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**styrkur 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**styrkur 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**styrkur 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**styrkur 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**styrkur 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**styrkur 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1% DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2), OHT: 4-hýdroxýtamoxífen, Dig: Digitónín.

= íbætt 25 pM E2

28. Til að meta blokkandi virkni íðefna skal 25pM E2 bætt í greiningarholur í röðum A-G. Prófa skal viðmiðunarstaðlana (tamoxífen og flútamíð) í hverri keyrslu. Í hverjum prófunargreiningarbakka skulu vera PC-holur meðhöndlaðar með 1 nM af E2 sem hægt er að nota sem gæðaeftirlit með hERα-HeLa-9903 frumulínu, VC-holur meðhöndlaðar með DMSO (eða viðeigandi leysi), 0,1% DMSO-holur meðhöndlaðar með DMSO-viðbót við hið íbætta E2 sem samsvarar íbótarsamanburðarsýninu (e. *Spike-in control*), holur meðhöndlaðar með lokastyrk 1 µM OHT og holur meðhöndlaðar með 100 µM Dig (tafla 5). Síðari greiningarbakkar skulu fylgja sama bakkaskipulagi án hola fyrir viðmiðunarstaðlana (tafla 6). Ef frumur af mismunandi uppruna (t.d. mismunandi umsáningartala, mismunandi lotur o.s.frv.) eru notaðar í sömu tilraun skal prófa viðmiðunarstaðlana fyrir hvern frumugjafa.

Tafla 6

Dæmi um skiptingu á styrkleika prófunar- og samanburðaríðefnum í greiningarbakkanum í greiningunni á ER-blokkum

Röð	Tamoxífen			Flútamíð			Prófunaríðefni 1			Prófunaríðefni 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**styrkur 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**styrkur 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**styrkur 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**styrkur 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**styrkur 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**styrkur 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1% DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: Samanburður með burðarefni (0,1% DMSO), PC: Jákvæður samanburður (1 nM E2), OHT: 4-hýdroxýtamoxífen, Dig: Digitónín.

: íbætt 25 pM af E2

29. Staðfesta skal að skiláhrif séu ekki til staðar, eins og við á, og ef grunur vaknar um skiláhrif skal breyta skipulagi bakkans til að forðast slíkar truflanir. Til dæmis er hægt að nota bakkaskipulag þar sem holurnar við skilin eru ekki notaðar.

30. Eftir að íðefnunum er bætt við skal láta greiningarbakkana standa í 5% CO2-ræktunarkassa við 37±1 °C í 20–24 klst. til að kalla fram vísigensafurðirnar.

31. Taka skal sérstakt tillit til þeirra efnasambanda sem eru mjög rokgjörn. Í slíkum tilvikum geta nálægar samanburðarholur gefið falsjákvæðar niðurstöður og skal hafa það í huga í ljósi væntanlegra og sögulegra samanburðargilda. Í nokkrum tilvikum þar sem rokgirni kann að valda áhyggjum getur notkun „bakkainnsigla“ hjálpað til við að einangra stakar holur meðan á prófun stendur og er í slíkum tilvikum mælt með notkun þeirra.

32. Framkvæma skal endurteknar endanlegar prófanir fyrir sama íðefni á mismunandi dögum til að tryggja óhæði.

Lúsíferasagreining

33. Nota má prófefni fyrir lúsíferasagreiningu sem fæst á almennum markaði (t.d. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 eða sambærilegt)) eða stöðluð lúsíferasagreiningarkerfi (t.d. Promega, E1500, eða sambærilegt) við greininguna að því tilskildu að viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar. Velja skal prófefnin fyrir greininguna á grundvelli næmleika ljósmælisins sem verður notaður. Þegar staðlað lúsíferasagreiningarkerfi er notað skal nota sundrunarprófefni fyrir frumurækt (t.d. Promega, E1531, eða sambærilegt) áður en hvarfefninu er bætt við. Lúsíferasaprófunarefnið skal nota í samræmi við leiðbeiningar framleiðandans.

GREINING GAGNA

Greining á ER-örva

34. Að því er varðar greiningu á ER-örva, til að ná fram hlutfallslegri umritunarvirkni fyrir PC (1 nM af E2), er hægt að greina ljómunarmerki frá sama bakka samkvæmt eftirfarandi þrepum (aðrar sambærilegar stærðfræðiaðferðir eru einnig ásættanlegar):

1. þrep Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.

3. þrep Meðaltalið fyrir staðlaðan PC er reiknað út.

4. þrep Deilt er í staðlað gildi hverrar holu í bakkanum með meðalgildi hins staðlaða PC (PC=100%).

Endanlegt gildi hverrar holu er hlutfallsleg umritunarvirkni fyrir þá holu í samanburði við PC-svörunina.

5. þrep Meðalgildi hlutfallslegu umritunarvirkninnar fyrir hvern styrkleikahóp prófunaríðefnisins er reiknað út. Svörunin felur í sér tvær stærðir: meðalumritunarvirknina (svörun) og styrkleikann þegar svörunin á sér stað (sjá eftirfarandi hluta).

Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi vakningu við EC_{50}, PC_{50} og PC_{10}

35. Til að reikna út EC50 þarf svörunarferilinn fyrir alla styrkleika en komið getur fyrir að það sé ómögulegt eða óraunhæft vegna takmarkana á styrkbili prófunarinnar (t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni). Þar eð EC50 og hámarksgildi vakningar (sem samsvarar hæsta gildi Hill-jöfnunnar) eru upplýsandi mæliþættir skal þó tilgreina þessa þætti þegar því verður við komið. Fyrir útreikninginn á EC50 og hámarksgildi vakningar skal nota viðeigandi tölfræðihugbúnað (t.d. tölfræðihugbúnaðinn Graphpad Prism).Ef umhverfður veldisvísisferill Hill á við fyrir gögnin um styrkháða svörun skal reikna EC50 út með eftirfarandi jöfnu (7. heimild):

Y=botn + (toppur-botn) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hill-hallagildi)) þar sem:

X er logri fyrir styrkleikann og

Y er svörunin og Y byrjar á botninum og fer upp á topp í sigmoid-ferli. Botninn er fastsettur við núll í umhverfða veldisvísisferli Hill.

36. Fyrir hvert prófunaríðefni skal tilgreina eftirfarandi:

RPCMax, sem er hámarksgildi svörunar sem prófunaríðefni framkallar, sett fram sem hundraðshluti svörunar sem 1 nM E2 framkallar á sama bakka, ásamt PCMax (styrkleiki í tengslum við RPCMax), og

að því er varðar jákvæð íðefni, styrkleikana sem framkölluðu PC10 og, ef við á, PC50.

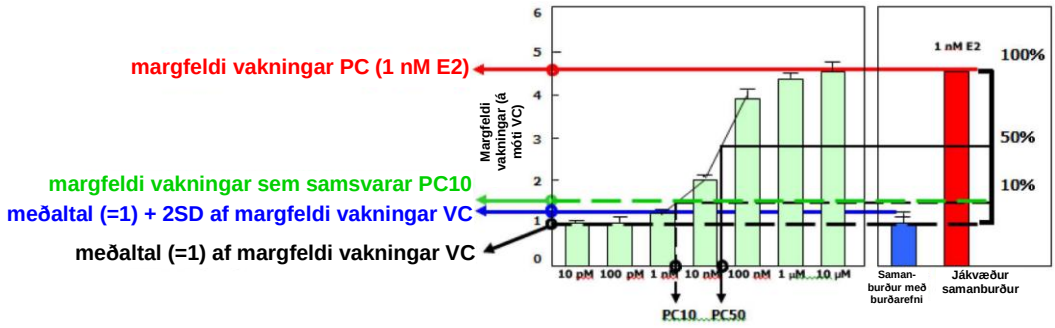
37. PCx-gildið er hægt að reikna út með innreikningi milli 2 punkta á X-Y-hnitakerfinu, öðrum beint fyrir ofan og hinum beint fyrir neðan PCx-gildi. Ef gagnapunktarnir sem liggja beint fyrir ofan og neðan PCx-gildið hafa annars vegar hnitin (a,b) og hins vegar (c,d) þá er hægt að reikna út PCx-gildið með eftirfarandi jöfnu:

log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

38. Lýsingu á PC-gildum er að finna á mynd 1 hér fyrir neðan.

Mynd 1

Dæmi um hvernig skal leiða út PC-gildi. PC (1 nM af E2) er hafður með á hverjum greiningarbakka



Greining á ER-blokkum

39. Að því er varðar greiningu á ER-blokkum, til að ná fram hlutfallslegri umritunarvirkni (RTA) á móti íbótarsamanburðarsýni (25 pM af E2) er hægt að greina ljómunarmerkin frá sama bakka samkvæmt eftirfarandi þrepum (aðrar sambærilegar stærðfræðiaðferðir eru einnig ásættanlegar):

1. þrep Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin. 3. þrep Meðaltal fyrir staðlaða íbótarsamanburðarsýnið er reiknað út.

4. þrep Deilt er í staðlað gildi hverrar holu í bakkanum með meðalgildi staðlaða íbótarsamanburðarsýnisins (íbæting í samanburð=100%).

Endanlegt gildi hverrar holu er hlutfallsleg umritunarvirkni fyrir þá holu í samanburði við svörun íbótarsamanburðarsýnisins.

5. þrep Meðalgildi hlutfallslegu umritunarvirkninnar fyrir hverja meðhöndlun er reiknað út.

Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi IC_{30}- og IC_{50}-vakningu

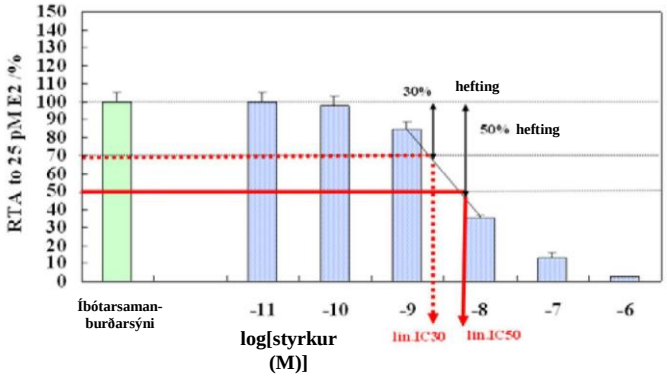
40. Að því er varðar jákvæð íðefni skal gefa upp styrkleikana sem framkölluðu IC30 og, ef við á, IC50.

41. ICx-gildið er hægt að reikna út með innreikningi milli 2 punkta á X-Y-hnitakerfinu, öðrum beint fyrir ofan og hinum beint fyrir neðan ICx-gildi. Ef gagnapunktarnir sem liggja beint fyrir ofan og neðan ICx-gildið hafa annars vegar hnitin (c,d) og hins vegar (a,b) þá er hægt að reikna út ICx-gildið með eftirfarandi jöfnu:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Mynd 2

Dæmi um hvernig skal leiða út IC-gildi. Íbótarsamanburðarsýni (25 pM af E2) er haft með á hverjum greiningarbakka.



RTA: hlutfallsleg umritunarvirkni

42. Niðurstöðurnar skulu byggjast á tveimur (eða þremur) óháðum keyrslum. Ef úr tveimur keyrslum koma samanburðarhæfar niðurstöður, og þar af leiðandi samanburðarnákvæmar, er ekki nauðsynlegt að framkvæma þriðju keyrsluna. Til að vera ásættanlegar skulu niðurstöðurnar:

— uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (sjá Viðmiðanir fyrir ásættanleika, 14.–20. lið),

— vera samanburðarnákvæmar.

Viðmiðanir um túlkun gagna

Tafla 7

Jákvæðar og neikvæðar viðmiðanir fyrir ákvarðanir í greiningu á ER-örva

Jákvæðar	Ef það RPCMax sem fæst er jafnt eða meira en 10% af svöruninni í jákvæða samanburðinum í a.m.k. tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.
Neikvæðar	Ef RPCMax nær ekki a.m.k. 10% af svöruninni í jákvæða samanburðinum í tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.

Tafla 8

Jákvæðar og neikvæðar viðmiðanir fyrir ákvarðanir í greiningu á ER-blokkum

Jákvæðar	Ef IC30 reiknast í a.m.k. tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum.
Neikvæð	Ef IC30 reiknast ekki út í tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum.

43. Viðmiðanir um túlkun gagna eru sýndar í töflum 7 og 8. Jákvæðar niðurstöður einkennast af bæði magni áhrifanna og styrksins þegar áhrifanna verður vart. Bæði þessara markmiða nást ef uppgefnar niðurstöður eru að fyrir greininguna á örva náist styrkur sem gefur gildin 50% (PC50) eða 10% (PC10) í jákvæða samanburðinum og ef gildi heftingarinnar í íbótarsamanburðarsýninu við greininguna á blokkum er 50% (IC50) eða 30% (IC30). Prófunaríðefni telst þó vera jákvætt ef hámarkssvörun sem prófunaríðefnið framkallar (RPCMax) er jöfn eða meiri en 10% svörunarinnar í jákvæða samanburðinum í a.m.k. tveimur af tveimur, eða tveimur af þremur, keyrslum, á meðan prófunaríðefni telst neikvætt ef RPCMax nær ekki a.m.k. 10% svörunarinnar í jákvæða samanburðinum í tveimur af tveimur eða tveimur af þremur keyrslum.

44. Hægt er að framkvæma útreikningana á PC10, PC50 og PCMax í greiningu á ER-örva og IC30 og IC50 í greiningu á ER-blokkum með töflureikni sem er aðgengilegur ásamt viðmiðunarreglunum um prófanir á opinberu vefsetri Efnahags- og framfarastofnunarinnar (2. heimild) ([2]).

45. Það ætti að nægja að ná fram PC10- eða PC50-gildum og IC30- eða IC50-gildum a.m.k. tvisvar. Ef grunngögn sama styrkbils sem fást með þessu sýna óásættanlega háan fráviksstuðul (CV; %) geta gögnin þó ekki talist áreiðanleg og tilgreina skal uppruna slíks breytileika. Fráviksstuðull óunnu gagnasettanna þriggja (þ.e. gögn um styrk ljómunar) fyrir gagnapunktana sem eru notaðir í útreikninginn á PC10 skal vera undir 20%.

46. Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru uppfylltar bendir það til þess að greiningarkerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin keyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta trygging þess að nákvæm gögn hafi fengist.

47. Að því er varðar greiningu á ER-örva, ef meiri upplýsingar þarf til viðbótar þeim sem gegna hlutverki við skimun og forgangsröðun vegna þessarar viðmiðunarreglu um prófanir fyrir jákvæð prófunaríðefni, einkum PC10-PC49-íðefni og íðefni sem grunur leikur á að oförvi lúsíferasa, er hægt að staðfesta með notkun ERα-blokkara að lúsíferasavirknin sem mælist sé eingöngu ERα-sértæk svörun (sjá viðbæti 2.1).

PRÓFUNARSKÝRSLA

48. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

HEIMILDIR

1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol., 71, 1459-1469.

3) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinol., 139, 4252-4263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

4) Spaepen M., et al. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

5) Kobayashi H., et al. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, Appl. Environ. Microbiol., 60(3), 953-9.

7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. Physiol., 235, E97-El02.

Viðbætir 2.1

FALSJÁKVÆÐAR NIÐURSTÖÐUR: MAT Á LJÓMUNARMERKJUM SEM ER EKKI MIÐLAÐ MEÐ VIÐTAKA

1. Falsjákvæðar niðurstöður greiningar á ER-örva geta fengist vegna virkjunar á lúsíferasageninu sem er ekki miðlað með estrógenviðtaka (ER) eða beinnar virkjunar genaafurðarinnar eða ótengdrar flúrljómunar. Slík áhrif koma fram sem ófullkominn eða óvenjulegur skammtasvörunarferill. Ef grunur vaknar um slík áhrif skal rannsaka áhrif ER-blokka (t.d. 4-hýdroxýtamoxífen (OHT) við styrkleika sem sýnir engin eiturhrif) á svörunina. Hreini blokkinn ICI 182780 kann að vera óhentugur í þessum tilgangi þar sem hæfilegur styrkur ICI 182780 kann að draga úr VC-gildinu og það hefur áhrif á gagnagreininguna.

2. Til að tryggja gildi þessarar nálgunar þarf að prófa eftirfarandi á sama bakka:

   — örvavirkni óþekkta íðefnisins með / án 10 μM OHT

   — VC (þrjú sett)

   — OHT (þrjú sett)

   — 1 nM af E2 (þrjú sett) sem jákvæður samanburður með örva

   — 1 nM af E2 + OHT (þrjú sett)

Viðmiðanir um túlkun gagna

Athugasemd: Allar holur skulu meðhöndlaðar með burðarefni í sama styrk.

— Ef örvavirkni óþekkta íðefnisins verður EKKI fyrir áhrifum af meðhöndluninni með ER-örva flokkast það sem „neikvætt“.

— Ef örvavirkni óþekkta íðefnisins er algerlega heft skal nota ákvörðunarviðmiðanirnar.

— Ef örvavirkni við lægsta styrkleika er jöfn PC10-svöruninni eða hærri henni er hefting óþekkta íðefnisins jöfn PC10-svöruninni eða hærri. Mismunurinn á svörununum í holum sem eru ekki meðhöndlaðar með ER-örvanum og holum sem eru meðhöndlaðar með honum er reiknaður út og þessi mismunur telst vera hin rétta svörun og skal nota fyrir útreikninginn á viðeigandi mæliþáttum til að gera kleift að ákvarða flokkun.

Greining gagna

Athugun á kröfunni um nothæfi

Frávikstuðullinn (CV) milli holna sem eru meðhöndlaðar við sömu skilyrði er athugaður.

1. Meðalgildið fyrir VC er reiknað út.

2. Meðalgildið fyrir VC er dregið frá gildi hverrar holu sem er ekki meðhöndluð með OHT.

3. Meðalgildið fyrir OHT er reiknað út.

4. Meðalgildið fyrir VC er dregið frá gildi hverrar holu sem er meðhöndluð með OHT.

5. Meðalgildið fyrir PC er reiknað út.

6. Hlutfallsleg umritunarvirkni allra annarra hola er reiknuð út með hliðsjón af jákvæða samanburðinum.

Viðbætir 2.2

TILREIÐSLA Á SERMI SEM ER MEÐHÖNDLAÐ MEÐ DEXTRANHÚÐUÐUM VIÐARKOLUM (DCC)

1. Meðhöndlun á sermi með dextranhúðuðum viðarkolum (DCC) er almenn aðferð til að fjarlægja estrógenefnaleifar úr sermi sem er bætt við frumuæti til að útiloka bjagaða svörun sem tengist estrógenleifum í sermi. Hægt er að meðhöndla 500 ml nautgripafósturssermis (FBS) með þessari aðferð.

Efnisþættir

2. Gerð er krafa um eftirfarandi efnivið og búnað:

   Efniviður

   Virk viðarkol

   Dextran

   Magnesíumklóríðhexahýdrat (MgCl2·6H2O)

   Súkrósi

   1 M HEPES-jafnalausn (pH 7.4)

   Ofurhreint vatn frá síukerfi

   Búnaður

   Gufusæft glerílát (aðlaga skal stærð eins og við á), almenn rannsóknarstofuskilvinda (sem hægt er að stilla hitastig á 4 °C)

Aðferð

3. Eftirfarandi aðferð er löguð að notkun á 50 ml skilvinduglösum:

   [1. dagur] Útbúið sviflausn með dextranhúðuðum viðarkolum úr 1 l af ofurhreinu vatni sem inniheldur 1,5 mM af $MgCl_2$, 0,25 M af súkrósa, 2,5 g af viðarkolum, 0,25 g af dextrani og 5 mM af HEPES og hrærið við 4 °C yfir nótt.

   [2. dagur] Setjið sviflausnina í 50 ml skilvinduglös og skiljið í skilvindu við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur. Fjarlægið flotið og geymið helminginn af viðarkolasetinu við 4 °C til að nota á 3. degi. Leysið hinn helminginn af viðarkolunum upp með FBS, sem hefur verið afþítt varlega til að forðast útfellingu og óvirkjað með hitun við 56 °C í 30 mínútur, og færið það svo í gufusæft glerílát s.s. keiluflösku. Hrærið varlega í sviflausninni við 4 °C yfir nótt.

   [3. dagur] Skammtið sviflausnina með FBS í skilvinduglös til að skilja í skilvindu við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur. Safnið FBS saman og færið yfir í nýja viðarkolasetið sem var útbúið og geymt á 2.degi. Leysið upp viðarkolasetið og hrærið varlega í þessari sviflausn í gufusæfðu gleríláti við 4 °C yfir nótt.

   [4. dagur] Skammtið sviflausnina fyrir skiljun við 10 000 snún./mín. við 4 °C í 10 mínútur og dauðhreinsið flotið með síun í gegnum 0,2 µm dauðhreinsaða síu. Þetta FBS sem er meðhöndlað með DCC skal geymt við -20 °C og hægt er að nota það í allt að eitt ár.

3. viðbætir.

VM7LUC-GREINING Á AÐVIRKJUN ESTRÓGENVIÐTAKA TIL AÐ GREINA ESTRÓGENVIÐTAKAÖRVA OG -BLOKKA

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu er notuð VM7Luc4E2-frumulínan ([1]). Samræmingarstofnunin fyrir mat á eiturefnafræðilegum staðgönguaðferðum (NICEATM) og samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) hafa fullgilt hana (1. heimild). VM7LUC-frumulínan tjáir aðallega innrænt ERα og lítið magn af innrænu ERβ (2.–4. heimild).

2. Þessi greining á við um margvísleg efni að því tilskildu að hægt sé að leysa þau upp í dímetýlsúlfoxíði (DMSO; CAS-númer 67-68-5), þau hvarfist ekki við DMSO eða frumuræktunarætið og séu ekki frumueitrandi í þeim styrkleika sem er prófaður. Ef ekki er hægt að nota DMSO er hægt að nota annað burðarefni s.s. etanól eða vatn (sjá 12. lið). Það nothæfi VM7Luc ER TA-greiningar á örva/blokkum sem sýnt hefur verið fram á gefur til kynna að gögn sem verða til með þessari greiningu kunni að upplýsa um ER-miðlaða verkunarmáta og gæti komið til álita við forgangsröðun efna til frekari prófunar.

3. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hER og hERß-miðlaða TA með því að mæla efnaljómun sem endapunkt. Notkun á efnaljómun í lífgreiningu er útbreidd þar sem hlutfall ljómunarmerkis er hátt miðað við bakgrunn (10. heimild). Virkni lúsíferasa úr eldflugum í frumumiðuðum greiningum getur þó ruglast vegna efna sem hefta lúsíferasaensímið og valda ýmist greinilegri heftingu eða aukinni ljómun vegna stöðgunar prótína (10. heimild). Í nokkrum vísigensgreiningum sem byggja á lúsíferasa með plöntuestrógenstyrk sem er yfir 1 µM hafa að auki verið skráð ljómunarmerki sem er ekki miðlað með viðtaka vegna ofvirkjunar á vísigeni lúsíferasans (9. og 11. heimild). Þó að skammtasvörunarferill gefi til kynna að raunvirkjun ER-kerfisins eigi sér stað við lægri styrk þarf að rannsaka gaumgæfilega, í ER TA-greiningarkerfum með innleiðslu sem er stöðug (sjá 2. viðbæti), tjáningu lúsíferasa sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða svipaðra efnasambanda sem grunur leikur á um að valdi plöntuestrógenlíkri ofvirkjun lúsíferasavísigens.

4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Greiningin er notuð til að sýna ER-bindilsbindingu og síðan yfirfærslu viðtaka- og bindilsflókans yfir í kjarnann. Í kjarnanum binst viðtaka- og bindilsflókinn við tiltekna DNA-svörunarþætti og aðvirkjar vísigenið (luc) sem leiðir til myndunar lúsíferasa og síðan losun ljóss sem hægt er að magngreina með ljósmæli. Hægt er að meta lúsíferasavirkni á fljótan og ódýran hátt með fjölda setta sem fást á almennum markaði. Í VM7Luc ER TA er notuð VM7, frumulína með brjóstakirtilkrabbameinsfrumum kvenna sem sýnir svörun við estrógenviðtaka, með stöðugt innleitt luc-vísigensmíð úr eldflugum sem stjórnast af fjórum estrógensvörunarþáttum sem staðsettir eru ofan við MMTV-stýriefnið til að greina efni

([1]) Fyrir júnímánuð 2016 var þessi frumulína tilgreind sem BG1Luc-frumulína. Upphaflega lýstu Geisinger og fl. (1998) (12. heimild) BG-1-frumum og eiginleikum þeirra var síðar lýst af vísindamönnum á vegum National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13. heimild). Tiltölulega nýlega kom í ljós að til eru tvö mismunandi afbrigði af BG-1-frumum sem vísindamenn nota, BG-1 Fr og BG-1 NIEHS. Ítarleg greining, þ.m.t. DNA-prófun, á þessum tveimur BG-1 afbrigðum frumulína sem Li og samstarfsmenn framkvæmdu (2014) (14. heimild) sýndi að BG-1 Fr var einstæð og að BG-1 NIEHS, þ.e. upprunalega frumulínan sem notuð var til að þróa greininguna, var ekki BG1-frumulínan með krabbameinsfrumum úr eggjastokkum kvenna, heldur þess í stað afbrigði af MCF7-frumulínunni með brjóstakrabbameinsfrumum kvenna. Frumulínan sem er notuð í greiningunni, sem upphaflega var nefnd BG1Luc4E2 (15. heimild), verður nú tiltekin sem VM7Luc4E2 („V“ = afbrigði, „M7“ = MCF7-frumur). Á sama hátt skal greiningin nú vera tiltekin sem VM7Luc ER TA. Þó að þetta breyti uppruna frumulínunnar sem greiningin er byggð á þá hefur þetta hvorki áhrif á birtar fullgildingarrannsóknir né not og beitingu þessarar greiningar til skimunar á estrógenvirkum/andestrógenvirkum íðefnum.

sem eru með virkni sem estrógenörvar eða -blokkar *í glasi*. Þetta MMTV-stýriefni sýnir eingöngu minni háttar víxlsvörun við önnur sterahormón og hormón sem eru ekki sterar. Viðmiðununum fyrir túlkun gagna er lýst í smáatriðum í 41. lið. Í stuttu máli greinist jákvæð svörun með ferli styrkháðrar svörunar sem inniheldur a.m.k. þrjá punkta með skekkjubilum sem skarast ekki (meðaltal ± SD) ásamt breytingu á sveifluvídd (stöðluð hlutfallsleg ljóseining [RLU]) sem er að lágmarki 20% af hámarksgildinu fyrir viðmiðunarstaðalinn (17-estradíól [E2; Cas-númer 50-28-2] fyrir greiningu á örvum, raloxífen vetnisklóríð [Ral; Cas-númer 84449-90-1]/E2 fyrir greiningu á blokkum).

VERKFERLI

Frumulína

6. Í greiningunni skal nota VM7Luc4E2 frumulínu með stöðuga innleiðslu. Frumulínan er sem stendur eingöngu fáanleg með tæknileyfissamningi frá University of California, Davis, California, USA ([1]), og frá Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([2]).

Stöðugleiki frumulínunnar

7. Til að viðhalda stöðugleika og heilleika frumulínunnar skal rækta frumurnar í fleiri en eina umsáningu úr frysta stofninum í frumuviðhaldsætinu (sjá 9. lið). Ekki skal rækta frumur oftar en 30 umsáningar. Að því er varðar VM7Luc4E2-frumulínuna eru 30 umsáningar u.þ.b. þrír mánuðir.

Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka

8. Fylgja skal verklagsreglunum sem tilgreindar eru í Guidance on Good Cell Culture Practice (5. og 6. heimild) til að tryggja gæði alls efniviðar og allra aðferða til að viðhalda heilleika, gildi og samanburðarnákvæmni þeirra starfa sem unnin eru.

9. VM7Luc4E2-frumur eru hafðar í RPMI 1640-æti með viðbættu 0,9% Pen-Strep og 8,0% nautgripafóstursermi (FBS) í sérstökum ræktunarkassa fyrir vefjarækt við 37 °C ± 1 °C, 90% ± 5 % raka og 5,0% ± 1 % CO_2/loft.

10. Þegar ~80% samfellu er náð eru VM7Luc4E2-frumur ræktaðar í undirrækt og undirbúnar í umhverfi án estrógens í 48 klst. fyrir ísetningu frumnanna í 96-hola bakka til að verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnum og til greiningar á estrógenháðri vakningu lúsíferasavirkni. Ætið án estrógens (EFM) inniheldur Eagle-æti með Dulbecco-breytingu (DMEM) án fenólrauðs, með viðbættu 4,5% FBS meðhöndluðu með dextranhúðuðum viðarkolum, 1,9% L-glútamíni og 0,9% Pen-Strep. Allur búnaður úr plasti skal vera án estrógenvirkni [sjá ítarlega aðferðarlýsingu (7. heimild)].

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

11. Samþykki eða höfnun prófunar byggir á matinu á viðmiðunarstaðli og niðurstöðum fyrir samanburð úr hverri tilraun sem er gerð á 96-hola bakka. Sérhver viðmiðunarstaðall er prófaður í mismunandi styrkleikum og það eru mörg sýni af

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404

hverjum viðmiðunar- og samanburðarstyrk. Niðurstöður eru bornar saman við gæðaeftirlit (QC) fyrir þessa mæliþætti sem voru leiddir út af rannsóknarsögulega gagnagrunnunum fyrir örva og blokka sem sérhver rannsóknarstofa skal búa til meðan hún sýnir fram á hæfni sína. Rannsóknarsögulegu gagnagrunnarnir eru stöðugt uppfærðir með gildum fyrir viðmiðunarstaðla og samanburð. Breytingar á búnaði eða aðstöðu rannsóknarstofu kunna að krefjast þess að gerðir séu uppfærðir rannsóknarsögulegir gagnagrunnar.

Örvaprófun

Skammtastærðarrannsókn

- Vakning: Vakning á bakka skal mæld með því að deila í meðaltal hæsta gildis hlutfallslegra ljóseininga (RLU) í E2-viðmiðunarstaðlinum með meðaltali RLU-gildis fyrir DMSO-samanburð. Venjulega næst fimmföld vakning en til að vera samþykkt þarf vakning að vera minnst fjórföld.

- Niðurstöður fyrir DMSO-samanburð: RLU-gildi samanburðar með leysi skal vera undir 2,5-földum staðalfrávikum fyrir rannsóknarsögulega samanburðinn með leysi fyrir meðaltal RLU-gildis.

- Tilraun sem uppfyllir hvoruga samþykktarviðmiðunina skal ekki notuð og hún endurtekin.

Ítarleg prófun

Prófunin felur í sér viðmiðanir fyrir ásættanleika úr skammtastærðarrannsókninni fyrir örva ásamt eftirfarandi:

- Niðurstöður fyrir viðmiðunarstaðal: Ferill viðmiðunarstuðuls styrkháðrar svörunar í E2 skal vera s-laga og hafa a.m.k. þrjú gildi innan línulega hluta ferils styrkháðrar svörunar.

- Niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð: Gildi RLU fyrir samanburðinn með metoxýklóri skal vera hærra en DMSO-meðaltalið plús þreföld staðalfrávik meðaltalsins fyrir DMSO.

- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

Blokkaprófun

Skammtastærðarrannsókn

- Lækkun: Lækkun á bakka er mæld með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis í Ral/E2 viðmiðunarstaðlinum með meðaltali RLU-gildis fyrir DMSO-samanburð. Venjulega næst fimmföld lækkun en til að vera samþykkt þarf lækkunin að vera minnst þreföld.

- Niðurstöður fyrir E2-samanburð: RLU-gildi í E2-samaburði skulu vera undir 2,5-földum staðalfrávikum í rannsóknar-sögulegum meðaltölum RLU-gildis í E2-samanburði.

- Niðurstöður fyrir DMSO-samanburð: RLU-gildi í DMSO-samanburði skal vera undir 2,5-földum staðalfrávikum í rannsóknarsögulegum meðaltölum RLU-gildis í samanburði með leysi.

- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

Ítarleg prófun

Prófunin inniheldur samþykktarviðmiðanir úr skammtastærðarrannsóknninni fyrir blokka ásamt eftirfarandi:

- Niðurstöður fyrir viðmiðunarstaðal: Ferill viðmiðunarstuðuls styrkháðrar svörunar í Ral/E2 skal vera s-laga og hafa a.m.k. þrjú gildi innan línulega hluta ferils styrkháðrar svörunar.

- Niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð: RLU-gildi í tamoxífen/E2-samanburði skal vera minna en meðaltalið fyrir E2-samanburð mínus þreföld staðalfrávik meðaltalsins fyrir E2-samanburðinn.

- Tilraun sem uppfyllir ekki allar samþykktarviðmiðanir skal ekki notuð og hún endurtekin.

Viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður og samanburður með burðarefni

Samanburður með burðarefni (greining á örvum og blokkum)

12. Burðarefnið sem er notað til að leysa upp prófunaríðefnið skal prófað sem samanburður með burðarefni. Burðarefnið sem var notað við fullgildingu VM7Luc ER TA-greiningarinnar var 1% (rúmmálshlutfall) dímetýlsúlfoxíð (DMSO, Cas-númer 67-68-5) (sjá 24. lið). Ef annað burðarefni en DMSO er notað skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni, ef við á.

Viðmiðunarstaðall (ákvörðun á skammtastærð fyrir örva)

13. Viðmiðunarstaðallinn er E2 (Cas-númer 50-28-2). Viðmiðunarstaðallinn fyrir skammtastærðarrannsókn er samsettur úr raðþynningu fjögurra styrkleika af E2 (1.84×10^{-10}, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ og $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), þar sem hver styrkur er prófaður í tveimur eins holum.

Viðmiðunarstaðall (ítarleg prófun á áhrifum örva)

14. E2 fyrir ítarlega prófun er samsett úr 1:2 raðþynningu sem samanstendur af 11 styrkleikum (á bilinu 3.67×10^{-10} til $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) af E2 í tveimur eins holum.

Viðmiðunarstaðall (ákvörðun á skammtastærð fyrir blokka)

15. Viðmiðunarstaðallinn er samsetning Ral (Cas-númer 84449-90-1) og E2 (Cas-númer 50-28-2). Ral/E2 fyrir skammtastærðarrannsókn er samsett úr raðþynningu þriggja styrkleika Ral ($3.06\ 10^{-9}$, $7{,}67\ 10^{-10}$, og $1{,}92\ 10^{-10}$M) plús fastur styrkur (9.18×10^{-11} M) af E2 í tveimur eins holum.

Viðmiðunarstaðall (ítarleg prófun á áhrifum blokka)

16. Ral/E2 fyrir ítarlega prófun er samsett úr 1:2 raðþynningu á Ral (á bilinu $2{,}45\ 10^{-8}$ til $9.57\ 10^{-11}$M) plús föstum styrk (9.18×10^{-11} M) af E2 sem samanstendur af níu styrkleikum Ral/E2 í tveimur eins holum.

Veikur jákvæður samanburður (örvi)

17. Veikur jákvæður samanburður er 9,06 10^{-6} M p,p'-metoxýklór (metoxýklór; Cas-númer 72-43-5) í æti án estrógens (EFM).

Veikur jákvæður samanburður (blokkar)

18. Veiki jákvæði samanburðurinn samanstendur af tamoxífeni (Cas-númer 10540-29-1) 3,36 10^{-6} M með 9,18 × 10^{-11} M E2 í æti án estrógens (EFM).

E2-samanburður (eingöngu greining á blokkum)

19. E2-samanburðurinn er 9,18 × 10^{-11} M E2 í æti án estrógens (EFM) og notaður sem neikvæður viðmiðunarsamanburður.

Margfeldi vakningar (örvi)

20. Vakning lúsíferasavirkni með viðmiðunarstaðlinum (E2) er mæld með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis E2-viðmiðunarstaðals með meðaltali RLU-gildis í DMSO-samanburði og niðurstaðan skal vera meiri en fjórföld.

Margfeldi lækkunar (blokkar)

21. Meðaltal lúsíferasavirkni með viðmiðunarstaðlinum (Ral/E2) er mælt með því að deila í meðaltal hæsta RLU-gildis Ral/E2-viðmiðunarstaðals með meðaltali RLU-gildis í DMSO-samanburði og skal vera meira en þrefalt.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð)

Burðarefni

22. Uppleysing prófunaríðefna skal vera í leysi sem leysir upp prófunaríðefnið og getur blandast frumuætinu. Vatn, etanól (95–100% hreinleiki) og dímetýlsúlfoxíð eru hentug burðarefni. Ef notað er dímetýlsúlfoxíð skal magnið ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall). Sýna skal fram á, að því er varðar öll burðarefni, að hámarksrúmmálið sem er notað sé ekki frumueitrandi og að það skerði ekki nothæfi greiningarinnar. Viðmiðunarstaðlar og samanburðir eru leystir upp í 100% leysi og svo þynntir út í viðeigandi styrkleika í æti án estrógens (EFM).

Tilreiðsla prófunaríðefna

23. Prófunaríðefnin eru leyst upp í 100% DMSO (eða viðeigandi leysi) og svo þynnt út í viðeigandi styrkleika í æti án estrógens (EFM). Öll prófunaríðefni skulu fá að ná jafnvægi við stofuhita áður en þau eru leyst upp og þynnt. Tilreiða skal nýjar prófunaríðefnislausnir fyrir hverja tilraun. Grugg og botnfall skal ekki vera sýnilegt í lausnunum. Stofna viðmiðunarstaðla og samanburða er hægt að tilreiða í miklu magni en þó skulu endanlegir viðmiðunarstaðlar og þynningar samanburðar og prófunaríðefna vera nýtilreiddar fyrir hverja tilraun og notuð innan 24 klukkustunda frá tilreiðslu.

Leysni og frumueiturhrif Atriði sem þarf að hafa í huga varðandi ákvörðun á skammtastærð

24. Skammtastærðarrannsókn samanstendur af sjö punkta 1:10 raðþynningum í tvítekinni keyrslu. Í upphafi eru prófunaríðefnin prófuð upp að hámarksstyrknum 1 mg/ml (~1 mM) fyrir örvaprófun og 20 µg/ml (~10 M) fyrir blokkaprófun. Skammtastærðarrannsóknir eru notaðar til að ákvarða eftirfarandi:

— upphafsstyrk prófunaríðefnisins sem skal nota í ítarlegri prófun

— þynningar prófunaríðefnis (1:2 eða 1:5) sem skal nota í ítarlegri prófun

25. Mat á lífvænleika frumna/frumueiturhrifum er að finna í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (7. heimild) og er haft með í skammtastærðarprófun og ítarlegri prófun. Frumueiturhrifaaðferðin sem var notuð til að meta lífvænleika frumna við fullgildingu VM7Luc ER TA (1. heimild) var aðlöguð eigindleg, sjónræn athugunaraðferð, þó er hægt að nota megindlega aðferð til að ákvarða frumueiturhrif (sjá aðferðarlýsingu (7. heimild)). Ekki er hægt að nota gögn sem er aflað við prófunaríðefnisstyrk sem veldur meira en 20% minnkun á lífvænleika.

Váhrif af prófunaríðefni og skipulagning greiningarbakka

26. Frumur eru taldar og þær settar í 96-hola bakka fyrir vefjaræktun (2×10^5 frumur í hverja holu) í æti án estrógens (EFM) og látnar standa í 24 klst. til að frumurnar nái að festast við bakkann. Ætið án estrógens er fjarlægt og þess í stað sett prófunar- og viðmiðunaríðefni í EFM og látið standa í 19–24 klst. Taka skal sérstakt tillit til þeirra efna sem eru mjög rokgjörn þar sem nálægar samanburðarholur kunna að gefa falsjákvæðar niðurstöður. Í slíkum tilvikum getur notkun „bakkainnsigla“ hjálpað til við að einangra stakar holur meðan á prófun stendur og er því mælt með notkun þeirra.

Skammtastærðarrannsóknir

27. Í skammtastærðarrannsóknum eru allar holurnar í 96-hola bakkanum notaðar til að prófa allt að sex prófunaríðefni sem sjö punkta 1:10 raðþynningar í tvíteknum keyrslum (sjá mynd 1 og 2).

— Í prófun til að ákvarða skammtastærð fyrir örva er notuð tvítekning með fjórum styrkleikum E2 sem viðmiðunarstaðall og samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn.

— Í prófun til að ákvarða skammtastærð fyrir blokka er notuð tvítekning með þremur styrkleikum Ral/E2 með $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2t sem viðmiðunarstaðall, með samhliða sýni í þremur holum fyrir E2- og DMSO-samanburðinn.

Mynd 1

Skipulag fyrir skammtastærðarrannsókn fyrir örva með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Skammstafanir: E2-1 til E2-4 = styrkleikar E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); TC1-1 til TC1-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 5 (TC5); TC6-1 að TC6-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 6 (TC6); VC = burðarefni (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.])

Mynd 2

Skipulag fyrir skammtastærðarrannsókn fyrir blokka með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Skammstafanir: E2 = E2-samanburður; Ral-1 til Ral-3 = styrkleikar raloxífens/E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); TC1-1 til TC1-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2 (TC2); TC3-1 til TC3-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 3 (TC3); TC4-1 til TC4-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 4 (TC4); TC5-1 til TC5-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 5 (TC5); TC6-1 að TC6-7 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 6 (TC6); VC = burðarefnil (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.])

Athugasemd: Öll prófunaríðefnin eru prófuð með 9,18 × 10 11 M E2.

28. Ráðlagt endanlegt magn nauðsynlegs ætis fyrir hverja holu er 200 µl. Eingöngu skal nota prófunarbakka þar sem lífvænleiki frumnanna í öllum holum er 80% eða meiri.

29. Ákvörðun á upphafsstyrkleika fyrir ítarlega prófun fyrir örva er lýst ítarlega í örvaaðferðarlýsingunni (7. heimild). Í stuttu máli skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

— Ef engir punktar á styrkferli prófunaríðefnisins eru fyrir ofan meðaltalið plús þrefalt staðalfrávik DMSO-samanburðarins skal framkvæma ítarlega prófun með 11 punkta 1:2 raðþynningu þar sem byrjað er á hámarks-styrknum sem er leysanlegur.

— Ef það eru punktar á styrkferli prófunaríðefnisins sem eru fyrir ofan meðaltalið plús þrefalt staðalfrávik DMSO-samanburðarins skal upphafsstyrkurinn fyrir 11 punkta þynningarkerfið í ítarlegri prófun vera einum logra hærra en styrkurinn sem gefur hæsta aðlagaða RLU-gildi í ákvörðuninni á skammtastærð. Kerfið fyrir 11 punkta þynningu verður byggt á annaðhvort 1:2 eða 1:5 þynningu samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

  Nota skal 11 punkta 1:2 raðþynningu ef það gefur styrkbil sem nær yfir allt svörunarsviðið byggt á ferli styrkháðrar svörunar sem myndast í skammtastærðarrannsókninni. Annars skal nota 1:5 þynningu.

— Ef fram kemur tvífasa ferill styrkháðrar svörunar vegna prófunaríðefnis í skammtastærðarrannsókninni skal rannsaka báða fasana í ítarlegri prófun.

30. Ákvörðun á upphafsstyrkleika fyrir ítarlega prófun fyrir blokka er lýst nákvæmlega í blokkaaðferðarlýsingunni (7. heimild). Í stuttu máli skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

— Ef engir punktar á styrkferli prófunaríðefnisins eru undir meðaltalinu mínus þrefalt staðalfrávik E2-samanburðarins skal framkvæma ítarlega prófun með 11 punkta 1:2 raðþynningu þar sem byrjað er á hámarksstyrk sem er leysanlegur.

— Ef það eru punktar á styrkferli prófunaríðefnisins sem eru undir meðaltalinu mínus þrefalt staðalfrávik E2-samanburðarins skal upphafsstyrkurinn fyrir 11 punkta þynningarkerfið í ítarlegri prófun vera einn af eftirfarandi:

- Styrkurinn sem gefur lægsta aðlagaða RLU-gildi í ákvörðuninni á skammtastærð.
- Hámarksstyrkur sem er leysanlegur (sjá blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild), mynd 14-2).
- Lægsti frumueitrandi styrkur (sjá blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild), mynd 14-3 fyrir svipað dæmi).

— Kerfið fyrir 11 punkta þynningu verður byggt á annaðhvort 1:2 eða 1:5 raðþynningu eða þynningu samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

Nota skal 11 punkta 1:2 raðþynningu ef það gefur styrkbil sem nær yfir allt svörunarsviðið byggt á ferli styrkháðrar svörunar sem myndast í skammtastærðarrannsókninni. Annars skal nota 1:5 þynningu.

Ítarlegar prófanir

31. Ítarleg prófun samanstendur af 11 punkta raðþynningu (annaðhvort 1:2 eða 1:5 raðþynningu sem byggir á upphafs-styrkleika fyrir ítarlegar prófanaviðmiðanir) þar sem hver styrkur er prófaður í þremur holusettum í 96-hola bakka (sjá mynd 3 og 4).

— Í ítarlegri prófun fyrir örva er notuð tvítekning 11 styrkleika af E2 sem viðmiðunarstaðall. Samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn og samhliða sýni í fjórum holum fyrir metoxýklórsamanburðinn (9.06×10^{-6} M) skulu vera með á hverjum bakka.

— Í ítarlegri prófun fyrir blokka er notuð tvítekning níu styrkleika af Ral/E2 með $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 sem viðmiðunarstaðall, með samhliða sýni í fjórum holum fyrir E2 $9{,}18\ 10^{-11}$ M-samanburðinn, samhliða sýni í fjórum holum fyrir DMSO-samanburðinn og samhliða sýni í fjórum holum fyrir tamoxífen $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

Mynd 3

Skipulag fyrir ítarlega prófun fyrir örva með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Skammstafanir: TC1-1 til TC1-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1; TC2-1 til TC2-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2; E2-1 til E2-11 = styrkleikar E2-viðmiðunarstaðals (frá háum að lágum); Meth = p,p' metoxýklór veikur jákvæður samanburður; VC = DMSO (1% rúmmálshlutfall) EFM samanburður með burðarefni.

Mynd 4

Skipulag fyrir ítarlega prófun fyrir blokka með 96-hola bakka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Skammstafanir: E2 = E2-samanburður; Ral-1 til Ral-9 = styrkleikar raloxífens/E2-viðmiðunarstaðalsins (frá háum að lágum); Tam = tamoxífen/E2 veikur jákvæður samanburður; TC1-1 til TC1-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 1 (TC1); TC2-1 til TC2-11 = styrkleikar (frá háum að lágum) prófunaríðefnis 2 (TC2); VC = burðarefni (DMSO [1% rúmmálshlutfall EFM.]).

Athugasemd: Eins og fram kemur innihalda allar viðmiðunar- og prófunarholur fastan styrk E2 (9,18×10–11 M).

32. Framkvæma skal endurteknar ítarlegar prófanir fyrir sama íðefni á mismunandi dögum til að tryggja óhæði. Framkvæma skal a.m.k. tvær ítarlegar prófanir. Ef niðurstöðurnar stangast á við hvor aðra (t.d. önnur prófunin er jákvæð og hin neikvæð), eða ef önnur prófunin er ófullnægjandi, skal framkvæma þriðju prófunina til viðbótar.

Mæling á ljómun

33. Ljómun er mæld á bilinu 300 til 650 nm með ljósmæli með inndælingu og hugbúnaði sem stýrir inndælingarmagninu og mælingarbilinu (7. heimild). Losun ljóss frá hverri holu er gefin upp sem RLU á hverja holu.

GREINING GAGNA

Ákvörðun á EC50/IC50

34. EC50-gildi (hálfur hámarkshrifstyrkur prófunaríðefnis [örvar]) og IC50-gildi (hálfur hámarksheftistyrkur prófunaríðefnis [blokkar]) eru ákvörðuð út frá gögnunum um styrk og svörun. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru jákvæð í einum eða fleiri styrkleikum er prófunaríðefnisstyrkurinn sem veldur hálfri hámarkssvörun (IC50 eða EC50) reiknaður út með greiningu með Hill-falli eða öðrum viðeigandi kosti. Hill-fallið er tvíkosta reiknilíkan með fjórum breytum sem tengir prófunaríðefnisstyrkinn við svörunina (fylgir að jafnaði s-ferli) með eftirfarandi jöfnu:

$$Y = Botn + \frac{(Toppur - Botn)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill - hallagildi}$$

Þar sem:

Y = svörun (þ.e. RLU)

X = logri styrksins

Botn = lágmarkssvörun

Toppur = hámarkssvörun

lg EC50 (eða lg IC50) = logri X sem svörun mitt á milli topps og botns

Hill-hallagildi = bratti ferilsins.

Með líkaninu eru reiknuð út bestu mátgæði fyrir breyturnar Toppur, Botn, Hill-hallagildi og IC50 og EC50. Fyrir útreikninginn á gildum EC50 og IC50 skal nota viðeigandi tölfræðihugbúnað (t.d. tölfræðihugbúnaðinn Graphpad PrismR).

Ákvörðun á einförum

35. Hægt er að auðvelda gott tölfræðilegt mat með því að hafa með (en ekki takmarkast við) Q-prófunina (sjá örva- og blokkaaðferðarlýsingar (7. heimild)) til að ákvarða „ónothæfar“ holur sem verða undanskildar í gagnagreiningunni.

36. Að því er varðar samhliða E2-viðmiðunarstaðla (tvö sýni) teljast öll aðlöguð RLU-gildi úr samhliða sýnum við gefinn styrkleika E2 sem einfarar ef gildi þeirra er meira en 20% yfir eða undir aðlöguðu RLU-gildi fyrir þann styrkleika í rannsóknarsögulega gagnagrunninum.

Söfnun og aðlögun ljósmælisgagna fyrir prófun til að ákvarða skammtastærð

37. Óunnin gögn frá ljósmælinum skulu færð í töflureiknissniðmát sem er hannað fyrir greininguna. Ákvarða skal hvort einfaragagnapunktar eru til staðar sem þarf að fjarlægja. (Sjá viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar m.t.t. mæliþátta sem eru ákvarðaðir í greiningunum.) Framkvæma skal eftirfarandi útreikninga:

Örvi

1. þrep Meðalgildið fyrir DMSO-samanburðinn með burðarefni (VC) er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.

3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (E2) er reiknað út.

4. þrep Meðalgildi EC50 fyrir prófunaríðefnin er reiknað út.

Blokkar

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.

3. þrep Meðalmargfeldi lækkunar fyrir viðmiðunarstaðalinn (Ral/E2) er reiknað út.

4. þrep Meðalgildið fyrir E2-viðmiðunarstaðalinn er reiknað út.

5. þrep Meðalgildi IC50 fyrir prófunaríðefnið er reiknað út.

Söfnun og aðlögun ljósmælisgagna fyrir ítarlega prófun

38. Óunnin gögn frá ljósmælinum skulu færð í töflureiknissniðmát sem er hannað fyrir greininguna. Ákvarða skal hvort einfaragagnapunktar eru til staðar sem þarf að fjarlægja. (Sjá viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar m.t.t. mæliþátta sem eru ákvarðaðir í greiningunum.) Framkvæma skal eftirfarandi útreikninga:

Örvi

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.

3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (E2) er reiknað út.

4. þrep Meðalgildi EC50 fyrir E2 og prófunaríðefnin er reiknað út.

5. þrep Meðalgildi aðlagaðs RLU-gildis fyrir metoxýklór er reiknað út.

Blokkar

1. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er reiknað út.

2. þrep Meðalgildið fyrir VC með DMSO er dregið frá hverju holugildi til að staðla gögnin.

3. þrep Meðalmargfeldi vakningar fyrir viðmiðunarstaðalinn (Ral/E2) er reiknað út.

4. þrep Meðalgildi IC50 fyrir Ral/E2 og prófunaríðefnin er reiknað út.

5. þrep Meðalgildi aðlagaðs RLU-gildis fyrir tamoxífen er reiknað út.

6. þrep Meðalgildið fyrir E2-viðmiðunarstaðalinn er reiknað út.

Viðmiðanir um túlkun gagna

39. VM7Luc ER TA er ætluð sem hluti af greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga til að hjálpa til við að forgangsraða efnum fyrir prófanir á innkirtlatruflunum í lífi. Hluti af þessu forgangsröðunarferli er flokkunin á prófunaríðefninu sem annaðhvort jákvæðu eða neikvæðu sem estrógenörvi eða -blokki. Jákvæðu og neikvæðu ákvörðunarviðmiðununum sem notaðar eru í VM7Luc ER TA-fullgildingarrannsókninni er lýst í töflu 1.

Tafla 1

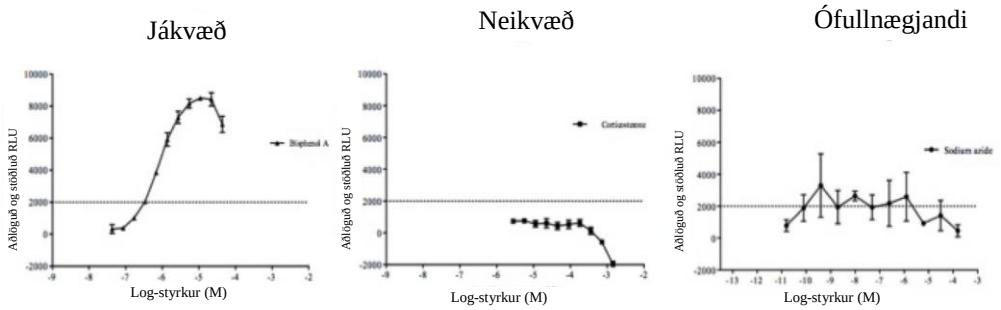
Jákvæðar og neikvæðar ákvörðunarviðmiðanir

VIRKNI SEM ÖRVI	
Jákvæð	— Öll prófunaríðefni sem eru flokkuð sem jákvæð fyrir virkni sem ER-örvi skulu hafa feril styrkháðrar svörunar sem samanstendur af grunnlínu og þá jákvæðum halla og sem að lokum endar í sléttu eða toppi. Í sumum tilvikum er aðeins hægt að greina tvo af þessum eiginleikum (grunnlína-halli eða halli-toppur). — Innan línunnar sem sýnir jákvæða hallann skulu vera a.m.k. þrír punktar með skekkjubilum sem skarast ekki (meðaltal ± SD). Punktar sem mynda grunnlínuna eru ekki hafðir með en toppurinn eða fyrsti hluti sléttunnar getur verið innan línulega hluta ferilsins. — Jákvæð flokkun krefst sveifluvíddar svörunar, mismunarins milli grunnlínu og topps, sem er a.m.k. 20% af hámarksgildi viðmiðunarstaðalsins, E2 (þ.e. 2000 RLU eða meira þegar hámarkssvörunargildi viðmiðunarstaðalsins [E2] er aðlagað í 10 000 RLU). — Ef hægt er skal reikna út EC50-gildi fyrir hvert jákvætt prófunaríðefni.
Neikvæð	Meðaltal aðlagaðrar RLU fyrir hvern tiltekinn styrk er við eða undir meðaltali RLU-gildisins í DMSO-samanburðinum plús þrefalt staðalfrávik RLU í DMSO.
Ófullnægjandi	Gögn sem ekki er hægt að túlka sem gild fyrir að sýna að virkni sé til staðar eða ekki vegna meiriháttar eigindlegra eða megindlegra takmarkana teljast ófullnægjandi og er ekki hægt að nota til að ákvarða hvort prófunaríðefnið sé jákvætt eða neikvætt. Endurprófa skal íðefnin.
BLOKKANDI VIRKNI	
Jákvæð	— Út frá gögnum prófunaríðefna fæst ferill styrkháðrar svörunar sem samanstendur af grunnlínu og síðan neikvæðum halla. — Innan línunnar sem skilgreinir neikvæða hallann skulu vera a.m.k. þrír punktar með skekkjubilum sem skarast ekki, punktar sem mynda grunnlínuna eru ekki hafðir með en fyrsti punktur sléttunnar getur verið innan línulega hluta ferilsins. — Lækkun í virkni ætti að vera a.m.k. 20% miðað við hámarksgildið með viðmiðunarstaðlinum, Ral/E2 (þ.e. 8000 RLU eða minna þegar hámarkssvörunargildi viðmiðunarstaðalsins [Ral/E2] er aðlagað í 10 000 RLU). — Hæsti styrkur prófunaríðefnisins sem er ekki frumueitrandi skal vera minni eða jafn $1x10^{-5}$ M. — Ef hægt er skal reikna út IC50-gildi fyrir hvert jákvætt prófunaríðefni.
Neikvæð	Allir gagnapunktar eru yfir EC80-gildinu (80% af E2-svöruninni eða 8000 RLU) við styrkleika undir $1,0\ 10^{-5}$ M.
Ófullnægjandi	Gögn sem ekki er hægt að túlka sem gild fyrir að sýna að virkni sé til staðar eða ekki vegna meiriháttar eigindlegra eða megindlegra takmarkana teljast ófullnægjandi og er ekki hægt að nota til að ákvarða hvort prófunaríðefnið sé jákvætt eða neikvætt. Endurprófa skal íðefnið.

40. Jákvæðar niðurstöður einkennast af bæði magni áhrifanna og styrksins þegar áhrifanna verður vart, ef því verður við komið. Dæmi um jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn eru sýnd í mynd 5 og 6.

Mynd 5

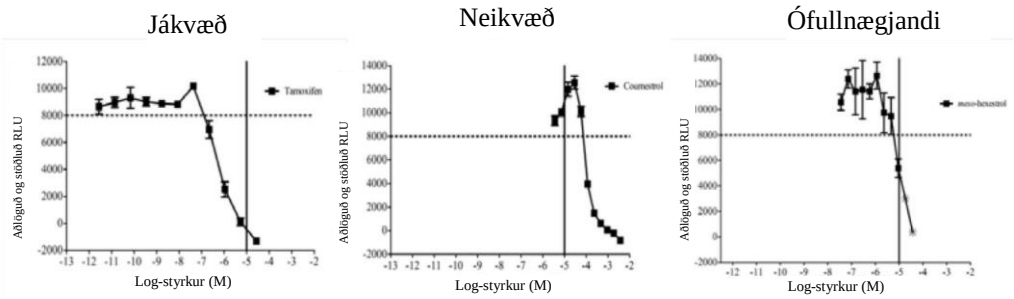
Dæmi um örva: jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn



Brotna línan sýnir 20% af E2-svörun, 2000 aðlagaðar og staðlaðar RLU

Mynd 6

Dæmi um blokka: jákvæð, neikvæð og ófullnægjandi gögn



Brotna línan sýnir 80 % af svörun í Ral/E2, 8000 aðlagaðar og staðlaðar RLU

Heila línan sýnir 1,00 10-5 M. Til að svörun teljist vera jákvæð skal hún vera undir 8000 RLU línunni og við styrk sem er undir 1,00 10-5 M.

Styrkleikar merktir með stjörnu í mesóhexeströllínuritinu sýnir lífvænleikastig „2“ eða hærra.

Prófunarniðurstöðurnar fyrir mesóhexeströl teljast ófullnægjandi gögn þar sem eina svörunin sem er undir 8000 RLU á sér stað við 1,00 10-5 M.

41. Útreikningana á EC50 og IC50 er hægt að gera með Hill-falli með fjórum breytum (sjá nánari upplýsingar í örva- og blokkaaðferðarlýsingu (7. heimild)). Þegar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika eru uppfylltar bendir það til þess að kerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekin keyrsla gefi nákvæm gögn. Endurtekning niðurstaðnanna úr fyrstu keyrslunni er besta trygging þess að nákvæm gögn hafi fengist (sjá 19. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“).

PRÓFUNARSKÝRSLA

42. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

HEIMILDIR

1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

3) Pujol P., et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

4) Weihua Z., et al. (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

5) Balls M., et al. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): bls. 270–273.

6) Coecke S., et al. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: bls. 261–287.

7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, In Vitro Mol. Toxicol.,13(1):67-82.

9) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol., 71(10):1459-69.

10) 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(6):646-57.

11) Kuiper G.G, et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4252-63.

12) Geisinger, et al. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

13) Baldwin, et al. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

14) Li, Y., et al. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, In Vitro & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

4. viðbætir.

GREINING Á AÐVIRKJUN STÖÐUGT INNLEIDDS ALFA-ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM MEÐ NOTKUN ERA CALUX FRUMULÍNUNNAR TIL AÐ GREINA VIRKNI ÍÐEFNA SEM ESTRÓGENÖRVAR OG -BLOKKAR

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í ERα CALUX-greiningu með aðvirkjun er notuð U2OS-frumulínan úr mönnum til að greina virkni sem estrógenörvar og -blokkar sem er miðlað með alfa-estrógenviðtaka úr mönnum (hERα). Með fullgildingarrannsókninni fyrir lífgreiningu á stöðugt innleiddu ERα CALUX með BioDetection Systems BV (Amsterdam, Holland) var sýnt fram á gildi og áreiðanleika greiningarinnar í fyrirhuguðum tilgangi (1. heimild). ERα CALUX-frumulínan tjáir eingöngu stöðugt innleitt ERα úr mönnum.

2. Þessi greining er hönnuð sérstaklega til að nema hERα-miðlaða aðvirkjun með því að mæla lífljómun sem endapunkt. Lífljómun er almennt notuð í lífgreiningu vegna þess hve suðhlutfall er hátt (4. heimild).

3. Skráð hefur verið að plöntuestrógenstyrkleikar hærri en 1 µM hafa ofvirkjað lúsíferasavísigenið sem leiðir til ljómunar sem fer ekki fram með miðlun viðtaka (5., 6. og 7. heimild). Því skulu hærri styrkleikar plöntuestrógens, eða annarra svipaðra efnasambanda sem kunna að ofvirkja lúsíferasatjáninguna, rannsakaðir gaumgæfilega í greiningum á aðvirkjun stöðugt innleidds estrógenviðtaka (sjá 2. viðbæti).

4. Lesa skal „ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLA GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Lífgreiningin er notuð til að meta ER-bindilsbindingu og síðari yfirfærslu viðtaka- og bindilsflókans yfir í kjarnann. Í kjarnanum binst viðtaka- og bindilsflókinn tilteknum DNA-svörunarþáttum og aðvirkjar vísigen lúsíferasa úr eldflugum sem leiðir til aukinnar frumutjáningar á lúsíferasaensíminu. Eftir að lúsíferasahvarfefninu lúsíferín er bætt við umbreytist lúsíferínið í lífljómunarafurð. Ljósið sem myndast er auðvelt að greina og magngreina með ljósmæli.

6. Prófunarkerfið notar CALUX-frumur með stöðugt innleiddan ERα . ERα CALUX-frumur koma úr U2OS-frumulínu með beinkímfrumu úr beinsarkmeini úr mönnum. U2OS-frumur úr mönnum voru stöðugt innleiddar með 3xHRE-TATA-Luc og pSG5-neo-hERα og notuð aðferðin með útfellingu með kalsíumfosfati. U2OS-frumulínan var valin sem sú frumulína sem hefur vísigen sem hefur bestu svörun við estrógeni (og öðrum sterahormónum) á grundvelli þeirrar athugunar að U2OS-frumulínan hafi sýnt litla eða enga innræna virkni viðtaka. Skortur á innrænum viðtökum var metinn með því að nota aðeins plasmíð með lúsíferasavísigenum sem sýndu enga virkni þegar viðtakabindlum var bætt við. Auk þess studdi þessi frumulína sterka hormónamiðlaða svörun þegar sammerktum viðtökum var bætt við tímabundið (2., 3. og 8. heimild).

7. Prófun á íðefnum fyrir estrógen- og andestrógenvirkni með ERα CALUX-frumulínunni felur í sér forskimunarkeyrslu og ítarlegar keyrslur. Í forskimunarkeyrslunni eru leysni, frumueiturhrif og nákvæmara styrkleikasvið prófunaríðefnisins fyrir ítarlega prófun ákvörðuð. Í ítarlegu keyrslunum eru nákvæmari styrkleikasvið prófunaríðefna prófuð í ERα CALUX-lífgreiningunum og því fylgt eftir með flokkun á prófunaríðefnunum miðað við örvun og blokkun.

8. Viðmiðununum fyrir túlkun gagna er lýst í smáatriðum í 59. lið. Í stuttu máli telst prófunaríðefni jákvætt m.t.t. örvunar ef a.m.k. tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins sýna svörun sem er jöfn eða meiri en 10% hámarkssvörunar með viðmiðunarstaðlinum 17β-estradíól (PC_{10}). Prófunaríðefni telst jákvætt m.t.t. blokkunar ef a.m.k. tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins sýna svörun sem er jöfn eða lægri en 80% hámarkssvörunar með viðmiðunarstaðlinum tamoxífen (PC_{80}).

VERKFERLI

Frumulínur

9. Í greiningunni skal nota U2OS ERα CALUX frumulínu með stöðuga innleiðslu. Hægt er að fá frumulínuna hjá BioDetection Systems BV, Amsterdam, Holland með tæknileyfissamningi.

10. Eingöngu skal nota frumurækt sem er laus við berfryminga. Þær frumulotur sem notaðar eru skulu annað hvort vera vottaðar sem lausar við berfrymingasmit eða framkvæma skal berfrymingaprófun á þeim fyrir notkun. Nota skal víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR) fyrir næma greiningu á berfrymingasýkingu (9. heimild).

Stöðugleiki frumulínunnar

11. Til að viðhalda stöðugleika og heilleika CALUX-frumnanna skulu frumurnar geymdar í fljótandi köfnunarefni (-80 °C). Að lokinni þíðingu frumnanna til að hefja nýja ræktun skal undirrækta frumurnar a.m.k. tvisvar áður en þær eru notaðar til að meta virkni íðefna sem estrógenörvar og -blokkar. Ekki skal undirrækta frumur oftar en í 30 umsáningum.

12. Til að vakta stöðugleika frumulínunnar til lengri tíma skal sannprófa svörunargetu prófunarkerfisins fyrir örva og blokka með því að meta EC_{50}- eða IC_{50}-gildi viðmiðunarstaðalsins. Að auki skal vakta hlutfallslega vakningu í sýninu úr jákvæðum samanburði (PC) og sýninu úr neikvæðum samanburði (NC). Niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við samþykktarviðmiðunina fyrir ERα CALUX-lífgreininguna fyrir örva (tafla 3C) eða blokka (tafla 4C). Viðmiðunarstaðlarnir, jákvæðir og neikvæðir samanburðir eru tilgreindir í töflu 1 og töflu 2 fyrir örva- og blokkaþáttinn eftir því sem við á.

Skilyrði við frumurækt og ísetningu á bakka

13. Rækta skal U2OS-frumur í vaxtaræti (DMEM/F12 (1:1) með fenólrauðum sem pH-litvísi, með viðbættu nautgripafóstursermi (7,5%), amínósýrum sem eru ekki lífsnauðsynlegar (1%), 10 einingum/ml af penisillíni, streptómýsíni og genetísíni (G-418) sem valmerkiefni). Frumurnar skulu settar í CO_2-ræktunarkassa (5% CO_2) við 37 °C og 100% raka. Þegar frumurnar ná 85–95% samrennsli skulu frumurnar annaðhvort ræktaðar í undirrækt eða tilreiddar fyrir sáningu í 96-hola míkrótítrunarbakka. Í síðarnefnda tilvikinu skal frumum þyrlað upp aftur í $1x10^5$ frumur/ml í estrógenlausu greiningaræti (DMEM/F12 (1:1) án fenólrauðs, með viðbættu nautgripafóstursermi meðhöndlað með dextranhúðuðum viðarkolum (5% rúmmálshlutfall), 10 einingum/ml af penisillíni og streptómýsíni) og settar í holurnar á 96-hola míkrótítrunarbakka (100 µl af jafnblandaðri frumusviflausn). Frumur skulu látnar standa fyrst í CO_2-ræktunarkassa (5% CO_2, 37 °C, 100% raka) í 24 klst. áður en kemur að váhrifum. Búnaður úr plasti skal vera estrógenlaus.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

14. Örva- og blokkavirkni prófunaríðefnis (prófunaríðefna) er prófuð í prófunarröðum. Prófunarröð samanstendur af að hámarki 6 míkrótítrunarbökkum. Hver prófunarröð felur í sér a.m.k. 1 heila röð af þynningum úr viðmiðunarstaðli, sýni úr jákvæðum samanburði, sýni úr neikvæðum samanburði og samanburði með leysi. Mynd 1 og 2 sýna uppsetningu bakkans fyrir prófunarraðir fyrir örva og blokka.

15. Hver þynning úr viðmiðunarstaðli, prófunaríðefni, öllum samanburði með leysi og jákvæðum og neikvæðum samanburði skal greind í þremur settum. Hvert þeirra þreföldu setta skal uppfylla kröfurnar sem settar eru fram í töflu 3A og töflu 4A.

16. Heil röð af þynningum úr viðmiðunarstaðlinum (17β-estradíól fyrir örvun, tamoxífen fyrir blokkun) er mæld á fyrsta bakkanum í hverri prófunarsyrpu. Til að hægt sé að bera greiningarniðurstöðurnar úr þeim 5 míkrótítrunarbökkum sem eftir eru saman við fyrsta míkrótítrunarbakkann sem inniheldur heilan styrksvörunarferil viðmiðunarstaðalsins skulu allir bakkarnir innihalda 3 samanburðarsýni: samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins sem prófaður er og áætlaðan styrk EC50 (örvun) eða IC50 (blokkun) í viðmiðunarstaðlinum. Hlutfall meðalsamanburðarsýna á fyrsta bakkanum og þeim 5 bökkum sem eftir eru skal uppfylla kröfurnar sem settar eru fram í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).

17. Fyrir hvern míkrótítrunarbakka innan prófunarraðar skal reikna út z-stuðul (10. heimild). Reikna skal út z-stuðulinn með því að nota svaranirnar við hæsta og lægsta styrk viðmiðunarstaðalsins Míkrótítrunarbakki telst gildur ef hann uppfyllir kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).

18. Viðmiðunarstaðallinn skal sýna s-laga skammtasvörunarferil. EC_{50} eða IC_{50}, leitt af svöruninni úr röðum af þynningum úr viðmiðunarstaðli, skulu uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).

19. Hver prófunarröð skal fela í sér sýni með jákvæðum og neikvæðum samanburði. Útreiknuð hlutfallsleg vakning bæði jákvæða og neikvæða samanburðarsýnisins skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).

20. Á meðan á öllum mælingum stendur skal mæla vakningarstuðul hæsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins með því að deila í meðaltal hæstu svörunar RLU í 17β-estradíól-viðmiðunarstaðli með meðaltali RLU-svörunar í viðmiðunarstaðalssamanburði með leysi. Þessi vakningarstuðull skal uppfylla lágmarkskröfurnar fyrir margfeldi vakningar eins og tilgreint er í töflu 3C (örvun) eða töflu 4C (blokkun).

21. Eingöngu míkrótítrunarbakkar sem uppfylla framangreindar samþykktarviðmiðanir teljast gildir og hægt er að nota þá til að meta svörun prófunaríðefna.

22. Samþykktarviðmiðanirnar gilda um bæði forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur.

Tafla 1

Styrkleikar viðmiðunarstaðals, jákvæðs samanburðar (PC) og neikvæðs samanburðar (NC) fyrir CALUX-lífgreininguna fyrir örva

	Efni	CAS-númer	Styrkbil prófunar (M)
Viðmiðunarstaðall	17β-estradíól	50-28-2	$1*10^{-13} – 1*10^{-10}$
Jákvæður samanburður (PC)	17α-metýltestósterón	58-18-4	$3*10^{-6}$
Neikvæður samanburður (NC)	kortikósterón	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tafla 2

Styrkleikar viðmiðunarstaðals, jákvæðs samanburðar (PC) og neikvæðs samanburðar (NC) fyrir CALUX-lífgreininguna fyrir blokka

	Efni	CAS-númer	Styrkbil prófunar (M)
Viðmiðunarstaðall	tamoxífen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-5}$
Jákvæður samanburður (PC)	4-hýdroxýtamoxífen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Neikvæður samanburður (NC)	resveratról	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tafla 3

Samþykktarviðmiðanir fyrir ERα CALUX-lífgreininguna fyrir örva

A - stök sýni á bakka		**Viðmiðun**
1	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir NC, PC, hverja þynningu prófunaríðefnisins og viðmiðunarstaðalsins, nema C0)	< 15%
2	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir samanburðina með leysi fyrir viðmiðunarstaðal og prófunaríðefni (C0, SC))	< 30%
3	Hámark LDH-leka, sem mælikvarði á frumueiturhrif	< 120%
B - innan eins míkrótítrunarbakka		
4	Hlutfall viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi (C0; bakki 1) og samanburðarins með leysi fyrir prófunaríðefnið (SC; bakkar 2 til x)	0,5 til 2,0
5	Hlutfall áætlaðs EC50 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og áætlaðs EC50 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C4m C8)	0,70 til 1,30
6	Z-stuðull fyrir hvern bakka	>0,6
C - innan stakrar greiningarraðar (allir bakkar innan einnar raðar)		
7	S-laga ferill viðmiðunarstaðals	Já (17ß-estradíól)
8	EC50-styrkbil viðmiðunarstaðals 17ß-estradíól	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Lægsta margfeldi vakningar fyrir hæsta styrkleika 17ß-estradíóls að því er varðar viðmiðunarstaðalssamanburðinn með leysi.	5
10	Hlutfallsleg vakning (%) PC	> 30%
11	Hlutfallsleg vakning (%) NC	< 10%

PC: jákvæður samanburður; NC: neikvæður samanburður; SC: samanburður með leysi fyrir prófunaríðefni; C0: viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi; SD: staðalfrávik; LDH: laktavetnissviptir

Tafla 4

Samþykktarviðmiðanir fyrir ERα CALUX-lífgreininguna fyrir blokka

A - stök sýni á bakka		**Viðmiðun**
1	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir NC, PC, hverja þynningu prófunaríðefnisins og viðmiðunarstaðalsins, samanburð með leysi (C0))	< 15%
2	Hámark %SD fyrir bakka í þremur settum (fyrir samanburð með burðarefni (VC) og hæsta styrkleika fyrir viðmiðunarstaðal (C8))	< 30%
3	Hámark LDH-leka, sem mælikvarði á frumueiturhrif	< 120 %
B - innan eins míkrótítrunarbakka		
4	Hlutfall viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi (C0; bakki 1) og samanburðarins með leysi fyrir prófunaríðefnið (SC; bakkar 2 til x)	0,70 til 1,30
5	Hlutfall áætlaðra IC50-styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og áætlaðra IC50-styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C4)	0,70 til 1,30
6	Hlutfall hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bakka 1 og hæstu styrkleika viðmiðunarstaðals á bökkum 2 til x (C8)	0,50 til 2,0
7	Z-stuðull fyrir hvern bakka	> 0,6
C - innan stakrar greiningarraðar (allir bakkar innan einnar raðar)		
8	S-laga ferill viðmiðunarstaðals	Já (tamoxífen)
9	IC50-styrkbil viðmiðunarstaðals (tamoxífen)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Lægsta margfeldi vakningar viðmiðunarstaðalssamanburðarins með leysi að því er varðar hæsta tamoxífenstyrkleikann.	2,5
11	Hlutfallsleg vakning (%) PC	< 70%
12	Hlutfallsleg vakning (%) NC	> 85%

PC: jákvæður samanburður; NC: neikvæður samanburður; VC: samanburður með burðarefni (samanburður með leysi án fasts styrks örvaviðmiðunarstaðals); SC: samanburður með leysi fyrir prófunaríðefni; C0: viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi; SD: staðalfrávik; LDH: laktavetnissviptir

Samanburður með leysi/burðarefni, viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður, neikvæður samanburður

23. Að því er varðar forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur skal nota sama samanburð með leysi/burðarefni, viðmiðunarstaðla, jákvæðan samanburð og neikvæðan samanburð. Að auki skal styrkleiki viðmiðunarstaðla, jákvæðra samanburða og neikvæðra samanburða vera hinn sami.

Samanburður með leysi

24. Prófa skal leysinn, sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið, sem samanburð með leysi. Dímetýlsúlfoxíð (DMSO, 1% (rúmmálshlutfall), CAS-númer 67-68-5) var notað sem burðarefni í fullgildingunni á ERα CALUX-lífgreiningunni. Ef notaður er annar leysir en dímetýlsúlfoxíð skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni. Vakin er athygli á að samanburðurinn með leysi fyrir blokkarannsóknir inniheldur fastan styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíól (u.þ.b. EC50-styrkur). Til að prófa leysinn sem notaður er í blokkarannsóknum skal tilreiða og prófa samanburð með burðarefni.

Samanburður með burðarefni (blokkun)

25. Að því er varðar prófanir á blokkun er föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíóli (u.þ.b. EC50-styrkur), bætt við greiningarætið. Til að prófa leysinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnin fyrir blokkun skal tilreiða greiningaræti án fasts styrks viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíóls. Þetta samanburðarsýni er tilgreint sem samanburðurinn með burðarefni. Dímetýlsúlfoxíð (DMSO, 1% (rúmmálshlutfall), CAS-númer 67-68-5) var notað sem burðarefni í fullgildingunni á ERα CALUX-lífgreiningunni. Ef notaður er annar leysir en dímetýlsúlfoxíð skal prófa alla viðmiðunarstaðla, samanburði og prófunaríðefni í sama burðarefni.

Viðmiðunarstaðlar

26. Viðmiðunarstaðallinn fyrir örva er 17β-estradíól (tafla 1). Viðmiðunarstaðlarnir samanstanda af röð þynninga með átta styrkleika 17β-estradíóls ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10–^{10}$ M).

27. Viðmiðunarstaðallinn fyrir blokka er tamoxífen (tafla 2). Viðmiðunarstaðlarnir samanstanda af röð þynninga með átta styrkleika tamoxífens ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Allir styrkleikar viðmiðunarstaðalsins fyrir blokka eru látnir standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíól ($3*10^{-12}$ M).

Jákvæður samanburður

28. Jákvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á örva er 17α-metýltestósterón (tafla 1).

29. Jákvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á blokkum er 4-hýdroxýtamoxífen (tafla 2). Jákvæði samanburðurinn fyrir blokka er látinn standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíóli ($3*10^{-12}$ M).

Neikvæður samanburður

30. Neikvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á örva er kortíkósterón (tafla 1).

31. Neikvæði samanburðurinn fyrir rannsóknir á blokkum er resveratról (tafla 2). Neikvæði samanburðurinn fyrir blokka er látinn standa með föstum styrk viðmiðunarstaðalsins fyrir örva, 17β-estradíóli ($3*10^{-12}$ M).

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu (sjá 14. lið og töflu 3 og 4 í „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“ í þessari prófunaraðferð)

Burðarefni

32. Leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefni skal leysa prófunaríðefnið upp að fullu og skal blandanlegur með frumuætinu. DMSO, vatn og etanól (95% til 100% hreinleiki) eru heppilegir leysar. Ef DMSO er notað sem leysir skal hámarksstyrkur DMSO í viðstöðunni ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall). Fyrir notkun skal prófa leysinn til að sannreyna að frumueiturhrif séu ekki fyrir hendi og að hann skerði ekki nothæfi greiningarinnar.

Tilreiðsla viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna

33. Viðmiðunarstaðlar, jákvæður samanburður, neikvæður samanburður og prófunaríðefni eru leyst upp í 100% DMSO (eða viðeigandi leysi). Viðeigandi (rað)þynningar skulu þá tilreiddar í sama leysi. Öll efni sem notuð eru skulu fá að ná jafnvægi við stofuhita áður en þau eru leyst upp. Grugg og botnfall skal ekki vera sýnilegt í nýtilreiddum stofnlausnum viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna. Hægt er að tilreiða stofna viðmiðunarstaðla og samanburða í miklu magni. Stofnlausnir prófunaríðefna skulu vera nýtilreiddar fyrir hverja tilraun. Lokaþynning viðmiðunarstaðla, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og prófunaríðefna skal vera nýtilreidd fyrir hverja tilraun og notuð innan 24 klukkustunda eftir tilreiðslu.

Leysni, frumueiturhrif og ákvörðun á skammtastærð.

34. Í forskimunarkeyrslunni er ákvörðuð leysni prófunaríðefnanna í leysinum sem valinn er. Tilreidd er lausn með hámarksstyrk upp á 0,1 M. Ef upp koma vandamál varðandi leysni í tengslum við þennan styrkleika skal tilreiða stofnlausnir með lægri styrkleika þar til prófunaríðefni leysast upp að fullu. Í forskimunarkeyrslunni eru prófaðar raðþynningar prófunaríðefnis í hlutfallinu 1:10. Hámark greiningarstyrks fyrir örva- eða blokkaprófanir er 1 nM. Að lokinni forskimun fæst viðeigandi nákvæmt styrkbil fyrir prófunaríðefni sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum. Þynningarnar sem eru notaðar fyrir ítarlegar prófanir skulu vera 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x og 3000x.

35. Prófun á frumueiturhrifum er að finna í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (11. heimild). Prófun á frumueiturhrifum felld inn í bæði forskimunarkeyrsluna og ítarlegu keyrslurnar. Aðferðin sem var notuð til að meta frumueiturhrif í fullgildingunni á ERα CALUX-lífgreiningunni var prófunin á leka laktavetnissviptis (LDH) ásamt eigindlegri, sjónrænni skoðun á frumum (sjá viðbæti 4.1) eftir váhrif frá prófunaríðefnum. Þó er hægt að nota aðrar megindlegar aðferðir til að ákvarða frumueiturhrif (t.d. greiningu með litmælingu sem byggir á tetrazólíum (MTT) eða CALUX-lífgreiningu á frumueiturhrifum). Almennt teljast styrkleikar prófunaríðefnis sem sýna meira en 20% minnkun á lífvænleika frumna vera frumueitrandi og eru því ekki nothæfir við mat á gögnum. Að því er varðar greininguna á leka laktavetnissviptis (LDH) telst styrkleiki prófunaríðefnisins vera frumueitrandi þegar hlutfall LDH-leka er hærra en 120%.

Váhrif af prófunaríðefni og skipulagning greiningarbakka

36. Eftir losun samrunninna ræktaðra frumna í flösku með trypsíni (e. *trypsinisation*) eru frumum þyrlað upp aftur í 1x105 frumur/ml í estrógenlausu greiningaræti. Hundrað µl af uppþyrluðum frumum eru settir í innri holur 96-hola míkrótítrunarbakka. Ytri holurnar eru fylltar með 200 µl af fosfatstilltri saltlausn (PBS) (sjá mynd 1 og 2). Frumurnar í bakkanum eru fyrst látnar standa í 24 klukkustundir í CO2-ræktunarkassa (við 5% CO2, 37 °C, 100% raki).

37. Þegar viðstöðu er lokið eru bakkarnir skoðaðir m.t.t. sjónrænna frumueiturhrifa (sjá viðbæti 4.1), mengunar og samflæðis. Eingöngu skal nota til prófunar bakka sem sýna engin sjónræn frumueiturhrif, mengun og hafa a.m.k. 85% samflæði. Ætið úr innri holunum er fjarlægt varlega og í stað þeirra sett 200 µl af estrógenlausu greiningaræti sem inniheldur viðeigandi þynningarraðir viðmiðunarstaðla, prófunaríðefna, jákvæðs samanburðar, neikvæðs samanburðar og samanburðar með leysi (tafla 5: rannsóknir á örva; tafla 6: rannsóknir á blokkum). Allir viðmiðunarstaðlar, prófunaríðefni, jákvæður

samanburður, neikvæður samanburður og samanburður með leysi eru prófaðir í þremur settum. Mynd 1 sýnir skipulag bakka fyrir prófanir á örva. Mynd 2 sýnir skipulag bakka fyrir prófanir á blokkum. Bakkaskipulagið fyrir forskimunarprófanir og ítarlegar prófanir er eins. Að því er varðar prófanir á blokkum innihalda allar innri holur, nema holur fyrir samanburð með burðarefni (VC), einnig fastan styrk viðmiðunarstaðals fyrir örva, 17β-estradíól ($3*10^{-12}$ M). Vakin er athygli á að viðmiðunarstöðlum C8 og C4 skal bætt við hvern TC-bakka.

38. Þegar frumurnar hafa orðið fyrir váhrifum frá öllum íðefnum skulu 96-hola míkrótítrunarbakkarnir látnir standa í aðrar 24 klukkustundir í CO2-ræktunarkassa (5% CO2, 37 °C, 100% raki).

Mynd 1

Bakkaskipulag fyrir 96-hola míkrótítrunarbakka fyrir forskimun og mat á áhrifum örva.

Bakki 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Síðari bakkar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi.

C(1–8) = röð þynninga (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) viðmiðunarstaðals.

PC = jákvæður samanburður

NC = neikvæður samanburður.

TCx-(1–8) = þynningar (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) prófunaríðefnis fyrir forskimunarkeyrslu og mat á örvaáhrifum prófunaríðefnis x.

SC = samanburður með leysi fyrir prófunaríðefnið (helst sami leysir og í C0, en mögulega úr annarri lotu).

Gráir reitir = ytri holur, fylltar með 200 µl af PBS.

Mynd 2

Bakkaskipulag fyrir 96-hola míkrótítrunarbakka fyrir blokkaforskimun og mat á áhrifum blokka.

Bakki 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Síðari bakkar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi.

C(1–8) = röð þynninga (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) viðmiðunarstaðals.

NC = neikvæður samanburður.

PC = jákvæður samanburður

TCx-(1–8) = þynningar (1–8, frá lægsta til hæsta styrks) prófunaríðefnis fyrir forskimunarkeyrslu og mat á örvaáhrifum prófunaríðefnis x.

SC = samanburður með leysi fyrir prófunaríðefnið (helst sami leysir og í C0, en mögulega úr annarri lotu).

VC = samanburður með burðarefni (samanburður með leysi án fasts styrks örvaviðmiðunarstaðals, 17β-estradíól).

Gráir reitir = ytri holur, fylltar með 200 µl af PBS.

Aths.: allar innri holur, nema holur fyrir samanburð með burðarefni (VC), innihalda einnig fastan styrk örvaviðmiðunarstaðals, 17β-estradíól (3,0*10–12 M).

Mæling á ljómun

39. Mælingunni á ljómun er lýst í smáatriðum í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (10. heimild). Fjarlægja skal ætið úr holunum og frumunum skal sundrað eftir 24 klukkustunda viðstöðu til að opna frumuhimnuna og gera kleift að mæla lúsíferasavirkni.

40. Að því er varðar mælingu á ljómun þá þarf ljósmæli sem er búinn tvöfaldri inndælingu fyrir þessa aðferð. Lúsíferasasvöruninni er komið af stað með inndælingu lúsíferínhvarfefnisins. Svörunin er stöðvuð með því að bæta við 0,2 M NaOH. Svörunin er stöðvuð til að koma í veg fyrir yfirfærslu ljómunar frá einni holu yfir í aðra.

41. Losun ljóss frá hverri holu er gefin upp sem hlutfallslegar ljóseiningar (RLU) á hverja holu.

Forskimunarkeyrsla

42. Niðurstöðurnar úr forskimunargreiningu eru notaðar til að ákvarða nákvæmara styrkleikasvið prófunaríðefna fyrir ítarlega prófun. Matinu á niðurstöðum úr forskimunargreiningu og ákvörðun á nákvæmara styrkleikasviði prófunaríðefna fyrir ítarlega prófun er lýst ítarlega í aðferðarlýsingunum fyrir greiningu á örva og blokkum (10. heimild). Hér er gefin stutt samantekt á aðferðunum við að ákvarða styrkbil prófunaríðefna fyrir prófanir á örva og blokkum. Sjá töflu 5 og 6 fyrir leiðbeiningar varðandi tilhögun raðþynningar.

Val á styrkleikum fyrir mat á örvaáhrifum

43. Í forskimunarkeyrslunni skal prófa prófunaríðefni með röð þynninga eins og tilgreint er í töflu 5 (örvun) og 6 (blokkun). Prófa skal alla styrkleika í þremur holusettum samkvæmt bakkaskipulaginu eins og tilgreint er á mynd 1 (örvun) og 2 (blokkun).

44. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 3) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunaríðefna. Ef einn eða fleiri míkrótítrunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktar-viðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrótítrunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.

45. Aðlaga skal upphafsstyrksbil prófunaríðefna og endurtaka skal forskimunarkeyrslu ef:

— frumueiturhrif koma fram. Endurtaka skal forskimunaraðferðina með lægri styrkleika prófunaríðefnisins sem er ekki frumueitrandi.

— forskimunin á prófunaríðefninu sýnir ekki heilan skammtasvörunarferil þar sem styrkleikarnir sem eru prófaðir koma af stað hámarksvakningu. Endurtaka skal forskimunarkeyrsluna með lægri styrkleika prófunaríðefnis.

46. Þegar gild vensl svörunar og skammtastærðar koma fram skal velja þann (lægsta) styrkleika þar sem hámarksvakning kemur fram og sem sýnir ekki frumueiturhrif. Hæsti styrkleiki prófunaríðefnis sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum skal vera þrefaldur þessi valdi styrkleiki.

47. Tilreiða skal heilar nákvæmar þynningarraðir prófunaríðefnisins með þeim þrepum þynningar sem tilgreind eru í töflu 5 þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum eins og ákvarðað var hér að framan.

48. Prófunaríðefni sem kallar ekki fram nein örvaáhrif skal prófað í ítarlegu keyrslunum þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum, sem er ekki frumueitrandi, sem greindist í forskimuninni.

Val á styrkleika fyrir mat á blokkaáhrifum

49. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 4) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunaríðefna. Ef einn eða fleiri míkrótítrunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrótítrunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.

50. Aðlaga skal upphafsstyrksbil prófunaríðefna og endurtaka skal forskimunarkeyrslu ef:

— frumueiturhrif koma fram. Endurtaka skal forskimunaraðferðina með lægri styrkleika prófunaríðefnisins sem er ekki frumueitrandi.

— forskimunin á prófunaríðefninu sýnir ekki heilan skammtasvörunarferil þar sem styrkleikarnir sem eru prófaðir koma af stað hámarksheftingu. Endurtaka skal forskimunina með því að nota lægri styrkleika prófunaríðefnis.

51. Þegar gild vensl svörunar og skammtastærðar finnast skal velja þann (lægsta) styrkleika þar sem hámarkshefting kemur fram og sem sýnir ekki frumueiturhrif. Hæsti styrkleiki prófunaríðefnis sem skal prófa í ítarlegu keyrslunum skal vera þrefaldur þessi valdi styrkleiki.

52. Tilreiða skal heilar nákvæmar þynningarraðir með þeim þrepum þynningar sem tilgreind eru í töflu 6 þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum eins og ákvarðað var hér að framan.

53. Prófunaríðefni sem kalla ekki fram nein blokkaáhrif skulu prófuð í ítarlegu keyrslunum þar sem byrjað er á hæsta styrkleikanum, sem er ekki frumueitrandi, sem var prófaður í forskimuninni.

Ítarlegar keyrslur

54. Eftir val á nákvæmu styrkbilunum skal prófa prófunaríðefni ítarlega með röð þynninga eins og tilgreint er í töflu 5 (örvun) og 6 (blokkun). Prófa skal alla styrkleika í þremur holusettum samkvæmt bakkaskipulaginu eins og tilgreint er á mynd 1 (örvun) og 2 (blokkun).

55. Eingöngu greiningarniðurstöður sem uppfylla samþykktarviðmiðanirnar (tafla 3 og 4) teljast gildar og hægt er að nota þær til að meta svörun prófunaríðefna. Ef einn eða fleiri míkrótítrunarbakkar í greiningarröð uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar skal greina aftur viðkomandi míkrótítrunarbakka. Ef fyrsti bakkinn sem inniheldur allar þynningarraðir viðmiðunarstaðalsins uppfyllir ekki samþykktarviðmiðanirnar verður að greina allar prófunarraðirnar aftur.

Tafla 5

Styrkleiki og þynning viðmiðunarstaðla, samanburða og prófunaríðefna sem notuð eru fyrir prófun á örva

Viðmiðunarstaðall 17β-estradíól		TCx - forskimunarkeyrsla		TCx - ítarleg keyrsla		Samanburðir	
styrkur (M)		þynning		þynning		styrkur (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - prófunaríðefni x
PC - jákvæður samanburður (17α-metýltestósterón)
NC - neikvæður samanburður (kortíkósterón)
C0 - viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi
SC - samanburður með leysi fyrir prófunaríðefni

Tafla 6

Styrkleiki og þynning viðmiðunarstaðla, samanburða og prófunaríðefna sem notuð eru fyrir prófun á blokka

Viðmiðunarstaðall tamoxífen		TCx - forskimunarkeyrsla		TCx - ítarleg keyrsla		Samanburðir	
styrkur (M)		þynning		þynning		styrkur (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3*10-	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Viðbættur örvi**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**styrkur (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradíól	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - prófunaríðefni x
PC - jákvæður samanburður (4-hýdroxítamoxífen)
NC - neikvæður samanburður (resveratról)
C0 - viðmiðunarstaðalssamanburður með leysi
SC - samanburður með leysi fyrir prófunaríðefni
VC - samanburður með burðarefni (inniheldur ekki fastan styrk örvaviðmiðunarstaðalsins 17β-estradíól (3.0*10–12 M))

Gagnasöfnun og gagnagreining

56. Eftir forskimunarkeyrslurnar og ítarlegu keyrslurnar skal ákvarða EC10, EC50, PC10, PC50 og hámarksvakningu (TCxmax) prófunaríðefnis fyrir örvaprófun. Reikna skal út IC20, IC50, PC80, PC50 og lágmarksvakningu (TCxmin) fyrir blokkaprófun. Á mynd 3 (örvun) og 4 (blokkun) er sett fram myndræn útfærsla á þessum mæliþáttum. Mæliþættirnir sem krafist er eru reiknaðir út á grundvelli hlutfallslegrar vakningar hvers prófunaríðefnis (miðað við hámarksvakningu viðmiðunarstaðalsins (=100%)). Nota skal ólínulegt aðhvarf (breytilegur halli, 4 mæliþættir) til að meta gögn samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$Y = Botn + \frac{(Toppur - Botn)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill-hallagildi})}$$

Þar sem:

X = logri skammts eða styrks

Y = svörun (hlutfallsleg vakning (%))

Toppur = hámarksvakning (%)

Botn = lágmarksvakning (%)

LogEC50 = sá logri styrks þar sem 50% hámarkssvörunar kemur fram.

Hill-hallagildi = hallastuðull eða Hill-halli

57. Óunnin gögn úr ljósmælinum, gefin upp sem hlutfallslegar ljóseiningar (RLU), skulu færð yfir í töflureikni fyrir gagnagreiningu sem er ætlaður fyrir forskimunarkeyrslur og ítarlegar keyrslur. Óunnin gögn skulu uppfylla samþykktar-viðmiðanirnar eins og tilgreint er í töflu 3A og 3B (örvun) eða 4A og 4B (blokkun). Ef óunnu gögnin uppfylla samþykktarviðmiðanirnar skal framkvæma eftirfarandi þrep við útreikning til að ákvarða nauðsynlega mæliþætti:

Örvun

— Meðal-RLU í viðmiðunarstaðalssamanburðinum með leysi skal dregið frá óunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.

— Meðal-RLU fyrir samanburðinn með leysi fyrir prófunaríðefni skal dregið frá hverjum óunnum greiningargögnum fyrir prófunaríðefnin.

— Hlutfallsleg vakning við hvern styrkleika viðmiðunarstaðalsins er reiknuð út. Stilla skal vakningu hæsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins við 100%.

— Reikna skal út hlutfallslega vakningu hvers styrkleika prófunaríðefnis samanborið við hæsta styrkleika viðmiðunarstaðals sem 100%.

— Meta skal greiningarniðurstöðurnar eftir ólínulegu aðhvarfi (breytilegur halli, 4 mæliþættir).

— Ákvarða skal EC50 og EC10 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

— Ákvarða skal EC50 og EC10 fyrir prófunaríðefnin.

— Ákvarða skal hámark hlutfallslegrar vakningar prófunaríðefnisins (TCmax).

— Ákvarða skal PC10 og PC50 fyrir prófunaríðefnin.

Að því er varðar prófunaríðefni getur verið ómögulegt að ná heilum skammtasvörunarferli, t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni. Þá er ekki hægt að ákvarða EC50, EC10 og PC50. Í slíkum tilvikum er aðeins hægt að ákvarða PC10 og TCmax.

Blokkun

— Meðal-RLU fyrir hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins skal dregið frá óunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.

— Meðal-RLU fyrir hæsta styrk viðmiðunarstaðalsins skal dregið frá óunnum greiningargögnum fyrir hvern viðmiðunarstaðlanna.

— Hlutfallsleg vakning við hvern styrkleika viðmiðunarstaðalsins er reiknuð út. Stilla skal vakningu lægsta styrkleika viðmiðunarstaðalsins við 100%.

— Reikna skal út hlutfallslega vakningu hvers styrkleika prófunaríðefnis samanborið við lægsta styrkleika viðmiðunarstaðals sem 100%.

— Meta skal greiningarniðurstöðurnar með ólínulegu aðhvarfi (breytilegur halli, 4 mæliþættir).

— Ákvarða skal IC50 og IC20 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

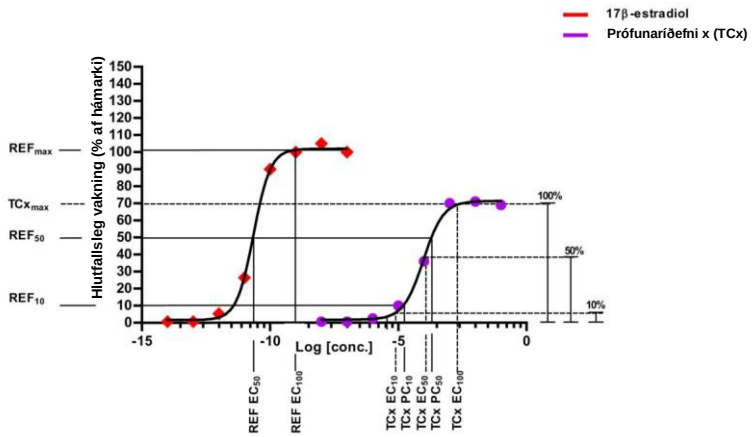
— Ákvarða skal IC50 og IC20 fyrir prófunaríðefnin.

— Ákvarða skal lágmark hlutfallslegrar vakningar prófunaríðefnisins (TCmin).

— Ákvarða skal PC80 og PC50 fyrir prófunaríðefnin.

Mynd 3

Yfirlit yfir mæliþætti sem eru ákvarðaðir í örvagreiningunni



EC10 = styrkur efnis þegar 10 % hámarkssvörunar þess kemur fram.

EC50 = styrkur efnis þegar 50 % hámarkssvörunar þess kemur fram.

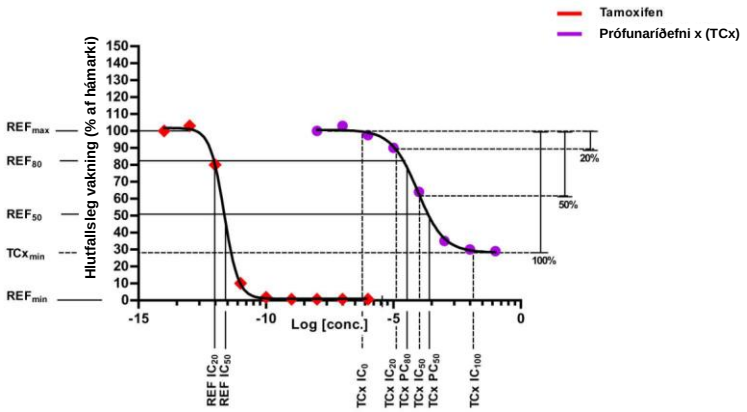
PC10 = styrkur prófunaríðefnis þegar svörun þess er jöfn EC10 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

PC50 = styrkur prófunaríðefnis þegar svörun þess er jöfn EC50 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

TCxmax = hámark hlutfallslegrar vakningar prófunaríðefnis.

Mynd 4

Yfirlit yfir mæliþætti sem eru ákvarðaðir í blokkagreiningunni



IC20 = styrkur efnis þegar 80% hámarkssvörunar þess kemur fram (20% hefting).

IC50 = styrkur efnis þegar 50% hámarkssvörunar þess kemur fram (50% hefting).

PC80 = styrkur prófunaríðefnis þegar svörun þess er jöfn IC20 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

PC50 = styrkur prófunaríðefnis þegar svörun þess er jöfn IC50 fyrir viðmiðunarstaðalinn.

TCxmin = lágmark hlutfallslegrar vakningar prófunaríðefnis.

Að því er varðar prófunaríðefni getur verið ómögulegt að ná heilum skammtasvörunarferli, t.d. vegna vandamála varðandi frumueiturhrif eða leysni. Þá er ekki hægt að ákvarða IC50, IC20 og PC50. Í slíkum tilvikum er aðeins hægt að ákvarða PC20 og TCmin.

58. Niðurstöðurnar skulu byggjast á tveimur (eða þremur) óháðum keyrslum. Ef úr tveimur keyrslum koma samanburðarhæfar niðurstöður, og þar af leiðandi samanburðarnákvæmar, er ekki nauðsynlegt að framkvæma þriðju keyrsluna. Til að vera ásættanlegar skulu niðurstöðurnar:

— uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (sjá Viðmiðanir fyrir ásættanleika, 14.-22. lið),

— vera samanburðarnákvæmar.

Viðmiðanir um túlkun gagna

59. Að því er varðar túlkun gagnanna og ákvörðunina hvort prófunaríðefni teljist vera jákvætt eða neikvætt skal nota eftirfarandi viðmiðanir:

Örvun

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera jákvætt ef:

1 TCmax er jafnt eða meira en 10% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF10).

2 Minnst tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins eru jafnir eða meira en REF10.

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera neikvætt ef:

1 TCmax fer ekki yfir 10% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF10).

2 Minna en tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins eru jafnir eða meira en REF10.

Blokkun

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera jákvætt ef:

1 TCmin er jafnt eða minna en 80 % af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF80 = 20% hefting).

2 Minnst tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins eru jafnir eða minna en REF80.

Í hverri ítarlegri keyrslu telst prófunaríðefni vera neikvætt ef:

1 TCmin er meira en 80% af hámarkssvörun viðmiðunarstaðalsins (REF80 = 20% hefting).

2 Minna en tveir samfelldir styrkleikar prófunaríðefnisins eru jafnir eða minna en REF80.

60. Til að lýsa mætti jákvæðrar svörunar prófunaríðefnis skal skrá magn áhrifanna (örvun: TCmax; blokkun: TCmin) og styrkleikann þegar áhrifanna verður vart (örvun: EC10, EC50, PC10, PC50; blokkun: IC20, IC50, PC80, PC50).

PRÓFUNARSKÝRSLA

61. Sjá 20. lið „ÞÆTTIR ER TA-GREININGAR“

HEIMILDIR

1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. Toxicol Sci. 83(1), 136-148.

3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. Endocrinology 142(3), 1156-1166.

4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. Biochem. Pharmacol., 71, 1459-1469.

6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinol., 139, 4252-4263.

7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 122, 204–211.

8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. Toxicol. Sci., 89(1), 173–187.

9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769-771.

10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

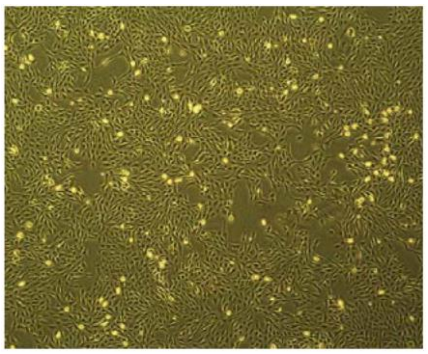
11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Viðbætir 4.1

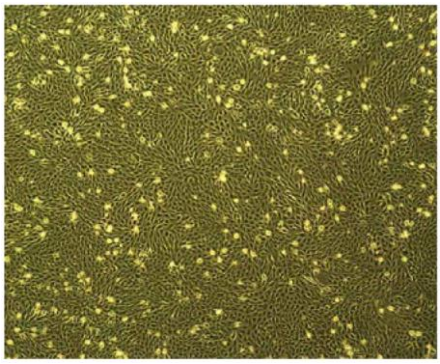
SJÓNRÆN SKOÐUN Á LÍFVÆNLEIKA FRUMNA



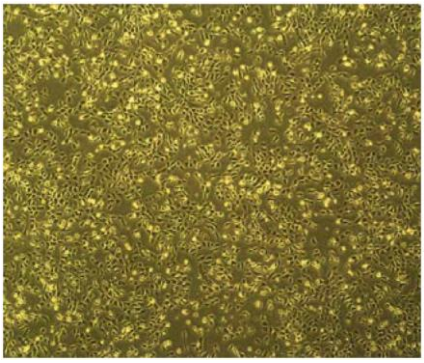
< 5% samrennsli. Nýsáðar frumur. 100% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



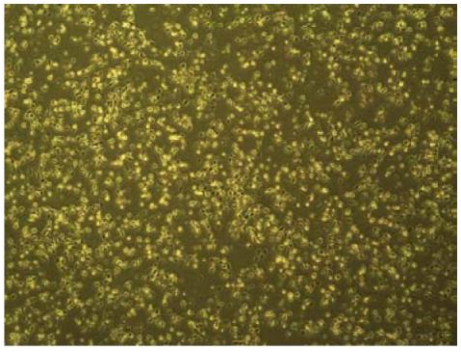
> 85% samrennsli. Á þessu stigi eru frumur látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnum. > 95% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



> 95% samrennsli. Frumur liggja þétt saman og byrja að vaxa hver yfir aðra. > 95% lífvænleiki frumna. Flokkun: „engin frumueiturhrif“



< 25% lífvænleiki frumna. Frumur losna sundur og snerting milli frumna minnkar. Frumur eru ávalar. Flokkun: „frumueiturhrif“



< 5% lífvænleiki frumna. Frumur losna alveg sundur og tenging milli frumna er rofin. Frumur eru ávalar. Flokkun: „frumueiturhrif“

B.67 *IN VITRO* MAMMALIAN CELL GENE MUTATION TESTS USING THE THYMIDINE KINASE GENE

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 490 um prófanir (2016). Prófunaraðferðir eru yfirfarnar og endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda, þarfa löggjafar og velferðar dýra. Eitilæxlisgreiningu músa (MLA) og TK6-prófun þar sem notað er týmidínkínasa-genasæti (TK) var upphaflega að finna í prófunaraðferð B.17. Síðan þá hefur MLA-sérfræðingahópur á vegum „International Workshop for Genotoxicity Testing“ (hér á eftir nefnt IWGT) þróað alþjóðlegar samræmdar ráðleggingar varðandi samþykktarviðmiðanir fyrir greiningar og túlkun gagna fyrir MLA (1.–5. heimild) og eru þessi tilmæli tekin upp í þessa nýju prófunaraðferð B.67. Þessi prófunaraðferð er gerð fyrir MLA og TK6-prófunina, þar sem er einnig notað TK-genasæti. MLA hefur verið mikið notuð í eftirlitsskyni en TK6 hefur verið notuð mun sjaldnar. Það skal tekið fram að þrátt fyrir að líkindi séu milli endapunktanna eru frumulínurnar tvær ekki jafngildar og í eftirlitsáætlunum getur komið skýrt fram val um aðra þeirra frekar en hina fyrir tiltekna notkun í eftirlitsskyni. Fullgilding MLA sýndi t.d. að hún hentar ekki eingöngu til að greina genastökkbreytingu heldur einnig getu prófunaríðefnis til að kalla fram skemmd á byggingu litnings. Þessi prófunaraðferð er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað skjal sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði (6. heimild).

2. Tilgangur prófana *í glasi* á genastökkbreytingum í spendýrafrumum er að greina genastökkbreytingar sem íðefni kalla fram. Frumulínurnar, sem eru notaðar í þessum prófunum, mæla frumstökkbreytingar í vísigenum, einkum innræna týmidínkínasageninu (*TK* fyrir frumur úr mönnum og *Tk* fyrir frumur úr nagdýrum sem vísað er til í heild sinni sem *TK* í þessari prófunaraðferð). Þessi prófunaraðferð er ætluð til notkunar með tveimur frumulínum: eitilæxlisfrumulínu músa, L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C (yfirleitt kölluð L5178Y) og eitilkímfrumulínu úr mönnum, TK6 (yfirleitt kölluð TK6). Jafnvel þótt þessar tvær frumulínur séu mismunandi vegna uppruna þeirra, frumuvaxtar, p53-stöðu o.s.frv. er hægt að framkvæma prófanir á *TK*-genastökkbreytingum á svipaðan hátt með báðum frumugerðunum eins og lýst er í þessari prófunaraðferð.

3. Sjálflitnings- og arfblendnieiginleikar týmidínkínasagensins gera það kleift að greina lífvænlegar þyrpingar þar sem frumur skortir ensímið týmidínkínasa eftir stökkbreytingu frá $TK^{+/-}$ til $TK^{-/-}$. Þessi skortur getur verið afleiðing atburða í erfðaefninu sem hafa áhrif á *TK*-genið, þ.m.t. bæði genastökkbreytingar (punktbreytingar, hliðrunarbreytingar, litlar úrfellingar o.s.frv.) og atburði í litningum (miklar úrfellingar, byggingarlegar litningabreytingar og endurröðun í jafnskiptingu). Síðari atburðirnir eru gefnir upp sem tap á arfblendni sem er algeng erfðafræðileg breyting á æxlisbæligenum í æxlismyndun hjá mönnum. Fræðilega séð er hægt að greina tap á öllum litningnum sem ber *TK*-genið, sem stafar af spóluskerðingu (e. *spindle impairment*) og/eða óaðskilnaði í frumuskiptingu, með MLA. Sambland af frumuerfðafræðilegri greiningu og sameindagreiningu sýnir raunar greinilega að sum TK-stökkbrigði í MLA eru afleiðing af óaðskilnaði. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga sýnir þó að prófanir á *TK*-genastökkbreytingum geta ekki greint efni sem valda mislitnun með áreiðanlegum hætti þegar stöðluðum viðmiðunum um frumueiturhrif er beitt (eins og lýst er í þessari prófunaraðferð) og því er ekki viðeigandi að nota þessar prófanir til að greina efni sem valda mislitnun (7.–9. heimild).

4. Í prófunum á *TK*-genastökkbreytingum verða til tveir aðgreindir svipfarsflokkar *TK*-stökkbrigða; stökkbrigði, sem vaxa á eðlilegan hátt, sem vaxa á sama hraða og TK-arfblendnifrumur og hægvaxandi stökkbrigði sem vaxa með langvarandi tvöföldunartíma. Stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt og hægvaxandi stökkbrigði eru þekkt sem stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar og stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar í MLA og sem stökkbrigði í snemmframkomnum og síðframkomnum þyrpingum í TK6. Sameindafræðilegt og frumuerfðafræðilegt eðli stökkbrigða í MLA, bæði í stórum og litlum þyrpingum, hefur verið rannsakað í smáatriðum (8. og 10.–13. heimild). Sameindafræðilegt og frumuerfðafræðilegt eðli snemmframkominna og síðframkominna TK6-stökkbrigða hefur einnig verið rannsakað ítarlega (14.–17. heimild). Að því er varðar báðar frumugerðirnar hafa hægvaxandi stökkbrigði orðið fyrir erfðafræðilegum skemmdum sem fela í sér meint vaxtarstýrigen nálægt *TK*-genasætinu sem leiðir til langvarandi tvöföldunartíma og myndunar síðframkominna eða lítilla þyrpinga (18. heimild). Framköllun hægvaxandi stökkbrigða hefur verið tengd íðefnum sem kalla fram stórsæjar breytingar í uppbyggingu litninga. Frumur með skemmdir sem fela ekki í sér meint vaxtarstýrigen nálægt *TK*-genasætinu vaxa ámóta hratt og móðurfrumurnar og verða að stökkbrigðum sem vaxa á eðlilegan hátt. Framköllun stökkbrigða, sem vaxa aðallega á eðlilegan hátt, er tengd við íðefni sem hafa fyrst og fremst virkni sem punktstökkbreytivaldar. Af þessum sökum er mikilvægt að telja bæði hægvaxandi stökkbrigði og stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt til að endurheimta öll stökkbrigðin og til að veita einhverja innsýn í það hvernig skemmd(ir) (stökkbreytivaldar á móti efnum sem valda litningabrenglun) prófunaríðefnið kallar fram (10. og 12. heimild og 18.–19. heimild).

5. Prófunaraðferðin er skipulögð þannig að hún veiti almennar upplýsingar sem eiga við um bæði MLA og TK6, sem og sértækar leiðbeiningar fyrir einstakar prófanir.

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja í lífi.

8. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem gætu leitt til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, (þ.e. hugsanleg verkun við prófunarkerfið) sem stafa ekki af verkunum milli prófunaríðefnis og erfðaefnis frumunnar; meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk, verkanir milli efnisþátta í ætinu (20.–21. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (22.–24. heimild). Frumueiturhrif sem fara yfir ráðlögðu hæstu frumueiturhrifagildin, eins og þau eru skilgreind í 28. lið, teljast of mikil fyrir MLA og TK6. Að auki skal tekið fram að prófunaríðefni sem eru týmidín-hliðstæðuefni, eða haga sér eins og týmidínhliðstæðuefni, geta aukið tíðni stökkbrigða með valvísum vexti á sjálfsprottn-um bakgrunnsstökkbrigðum meðan frumumeðhöndlun stendur yfir og útheimta fleiri prófunaraðferðir til fullnægjandi mats (25. heimild).

9. Sértækar aðlaganir á þessari prófunaraðferð gætu reynst nauðsynlegar vegna tilbúinna nanóefna en þeim er ekki lýst í þessari prófunaraðferð.

10. Áður en þessi prófunaraðferð 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.

11. Stökkbreyttar frumur sem skortir týmidínkínasaensímvirkni vegna stökkbreytingarinnar $TK^{+/-}$ til $TK^{-/-}$ eru þolnar gagnvart frumuhemjandi áhrifum pýrimídínhliðstæðunnar tríflúortýmidíns (TFT). Frumur með *TK* eru næmar gagnvart tríflúortýmidíni (TFT) sem hindrar efnaskipti frumna og stöðvar frekari frumuskiptingu. Stökkbreyttar frumur eru því færar um að fjölga sér ef tríflúortýmidín (TFT) er í umhverfi þeirra og mynda sýnilegar þyrpingar en það geta frumur sem innihalda TK-ensímið ekki.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. Frumur í svifblöndu eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu í hæfilegan tíma (sjá 33. lið), bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar (sjá 19. lið), og síðan afræktaðar til þess að ákvarða frumueiturhrif og láta svipfarstjáningu koma fram áður en stökkbrigðin eru valin. Að því er varðar MLA eru frumueiturhrif ákvörðuð með hlutfallslegum heildarvexti (RTG—sjá 25. lið) og að því er varðar TK6 með hlutfallslegri lifun (RS—sjá 26. lið). Meðhöndluðu ræktirnar eru látnar vera í vaxtarætinu í hæfilegan tíma, sem er miðaður við hverja frumugerð (sjá 37. lið), svo að svipfarstjáning framkallaðra stökkbreytinga verði því sem næst í hámarki. Eftir að svipfarstjáning er komin fram er tíðni stökkbrigða ákvörðuð með því að sá þekktum fjölda frumna á æti, sem inniheldur valvísa efnið, í því skyni að finna stökkbreyttar þyrpingar og á æti, sem er án valvísa efnisins, til að ákvarða klónunarhæfnina (lífvænleikann). Eftir ræktun í hæfilega langan tíma eru þyrpingarnar taldar. Tíðni stökkbrigða er reiknuð út frá fjölda stökkbreyttra þyrpinga sem er leiðrétt með klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Frumur

13. Að því er varðar MLA: Þar eð MLA var þróað og eiginleikum hennar lýst með því að nota $TK^{+/-}$ -3.7.2C-undirlínu L5178Y frumna verður að nota þessa sérstöku undirlínu fyrir MLA. Frumulínan L5178Y var fengin úr eitilæxli hóstakirtils sem metýlkólantren kallaði fram hjá DBA-2-mús (26. heimild). Clive og samstarfsfólk meðhöndluðu L5178Y-frumur (sem Clive nefndi $TK^{+/+}$ -3) með etýlmetansúlfónati og einangruðu $TK^{-/-}$ (nefnt $TK^{-/-}$ -3.7) -klón með því að nota brómódeoxýúridín sem valvísa efnið. Úr $TK^{-/-}$-klóninu voru einangruð sjálfsprottið $TK^{+/-}$-klón (nefnt $TK^{+/-}$ -3.7.2.) og

undirklón (nefnt $TK^{+/-}$-3.7.2C) og eiginleikum þeirra lýst til notkunar í MLA (27. heimild). Kjarngerð fyrir frumulínuna hefur verið birt (28.–31. heimild). Dæmigerður litningafjöldi er 40. Einn miðheftur litningur (t12;13) skal talinn sem einn litningur. *TK*-genasæti músar er staðsett á fjarenda 11. litnings. Frumulínan L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C er með stökkbreytingar í báðum p53-genasamsætum og myndar stökkbreytt -p53 prótín (32. og 33. heimild). Geta prófunarinnar til að greina skemmdir í stórum stíl stafar sennilega af p53-stöðu $TK^{+/-}$-3.7.2C-frumulínunnar (17. heimild).

14. Að því er varðar TK6: TK6 er eitilkímfrumulína úr mönnum. Móðurfrumulínan er frumulínan WI-L2, sem var umbreytt með Epstein-Barr-veirunni, sem var upphaflega fengin úr 5 ára gömlum dreng með arfgengan hnattrauðkornakvilla. Fyrsta einangraða klóninu, HH4, var stökkbreytt með ICR191 og arfblendin *TK*-frumulína, TK6, varð til (34. heimild). TK6-frumur eru næstum því tvílitna og hin dæmigerða kjarngerð er 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35. heimild). *TK*-genasæti hjá mönnum er staðsett á langarmi litnings 17. TK6 er p53-virkjanleg frumulína vegna þess að hún er með villigerð p53-raðar í báðum genasamsætum og tjáir einungis villigerð p53-prótíns (36. heimild).

15. Þegar viðmiðunarstofni er fyrst komið á eða hann endurnýjaður er ráðlegt, að því er varðar bæði MLA og TK6, að prófunarstofan gangi úr skugga um að berfrymingasmit sé ekki fyrir hendi, greini kjarngerð frumnanna eða liti litninga sem eru með *TK*-genasæti og athugi tvöföldunartíma hópsins. Nauðsynlegt er að vita hver er eðlileg lengd frumuhrings frumna sem eru notaðar í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefna frumueiginleika (16., 19. og 37. heimild). Þessi viðmiðunarstofn skal geymdur við eða undir -150 °C og notaður til að tilreiða alla vinnslustofna frumna.

16. Annaðhvort áður en miklum fjölda vinnslustofna, sem eru varðveittir við lághita, er komið á eða rétt áður en þeir eru notaðir í tilraun kann að vera nauðsynlegt að fjarlægja stökkbreyttar frumur sem eru þegar til staðar í ræktunum [nema tíðni stökkbrigða (MF) í samanburði með leysi sé þegar innan ásættanlegs sviðs — sjá töflu 2 fyrir MLA]. Þetta er gert með því að nota metótrexat (amínópterín) til að velja frá frumur sem skortir TK og bæta týmidíni, hýpóxantíni og glýsíni (L5178Y) eða 2´-deoxýsýtidíni (TK6) við ræktunina til að tryggja að vöxtur TK-virkjanlegra frumna (19. og 38.–39. heimild) og TK6 (40. heimild) verði í hámarki. Almennar ráðleggingar um góðar starfsvenjur fyrir viðhald frumuræktа sem og sérstakar ráðleggingar fyrir L5178Y- og TK6-frumur er að finna í 19., 31., 37., 39. og 41. heimild. Gagnahirsla fyrir frumur með vel skilgreinda eiginleika er tiltæk (37. heimild) fyrir rannsóknarstofur sem þurfa viðmiðunar-frumustofna til að hefja annaðhvort MLA eða TK6 eða til að afla nýrra viðmiðunarfrumustofna.

Æti og ræktunarskilyrði

17. Að því er varðar báðar prófanir skal nota viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (t.d. ræktunarílát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO2 og ræktunarhitastig við 37 °C) til að viðhalda frumum í rækt. Frumuræktum skal ávallt viðhaldið við skilyrði sem tryggja að þær vaxi í veldisvaxtarfasa. Sérstaklega er mikilvægt að velja æti og ræktunar-aðstæður sem tryggja að vöxtur frumna meðan tjáningartímabilið stendur yfir og klónun bæði stökkbreyttra og óstökkbreyttra frumna verði í hámarki. Að því er varðar MLA og TK6 er einnig mikilvægt að ræktunaraðstæður tryggi að vöxtur bæði stórra þyrpinga/snemmframkominna og lítilla þyrpinga/síðframkominna TK-stökkbrigða verði í hámarki. Nánari upplýsingar um ræktun, þ.m.t. þörf á að hita óvirkjað hrossasermi á tilhlýðilegan hátt ef RPMI-æti er notað meðan stökkbrigðin eru valin, er að finna í 19., 31., 38.–40. og 42. heimild.

Undirbúningur ræktа

18. Frumum úr stofnræktum er fjölgað og sáð á ræktunaræti í hæfilegum þéttleika til að ræktir í sviflausnum haldi áfram í veldisvexti á meðhöndlunar- og tjáningartímanum.

Efnaskiptavirkjun

19. Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru L5178Y- og TK6-frumur vegna þess að þær 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 (43.–45. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og β-naptóflavóns (46.–51. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (52. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að vekja oxídasa sem gegna

mismunandi hlutverki (45.–49. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1–2% en má auka upp í 10% (rúmmálshlutfall) í síðasta prófunaræetinu. Flokkur prófunaríðefnanna getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður.

Tilreiðsla prófunaríðefnis

20. Prófunaríðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar (sjá 21. 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 (53.–55. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

PRÓFUNARSKILYRÐI

Leysar

21. Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefnis án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunarinnar, 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 ræktunaræti). Vel þekktir leysar eru 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 þeir vel þekktu (t.d. etanól eða aseton) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þau séu samrýmanleg við prófunaríðefnin og prófunarkerfið og hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkleikann sem er notaður. Ef þessi gögn til stuðnings liggja ekki fyrir er mikilvægt að bæta við ómeðhöndluðum samanburði (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, valdi hvorki skaðlegum né stökkbreytandi áhrifum.

MÆLINGAR Á FRUMUEITURHRIFUM OG VAL Á MEÐHÖNDLUNARSTYRKLEIKUM

22. 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 28. lið), útfellingu í ræktunarætinu (sjá 29. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 8. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í ætinu þegar því er bætt í það skal stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarætið þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.

23. Val á styrk byggir á frumueiturhrifum og öðrum atriðum (sjá 27.–30. lið). Ekki er krafist upphafsprófunar en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsprófun verið gagnlegt til að skilgreina betur styrkleikana sem á að nota í aðaltilrauninni. Þótt frummat á frumueiturhrifum sé gert er enn krafist mælingar á frumueiturhrifum fyrir hverja ræktun í aðaltilrauninni. Ef tilraun til að ákvarða skammtastærð er framkvæmd skal hún spanna vítt styrkleikasvið og annaðhvort er hægt að stöðva hana á 1. degi eftir meðhöndlun eða halda henni áfram í tvo daga meðan tjáning stendur yfir, fram að vali á stökkbrigðum (ef það kemur í ljós að styrkleikar, sem eru notaðir, eru viðeigandi).

24. Ákvarða skal frumueiturhrif fyrir hverja prófunarrækt og samanburðarrækt fyrir sig: aðferðir fyrir MLA (2. heimild) og TK6 (15. heimild) eru skilgreindar af alþjóðlega samþykktum starfsvenjum.

25. Fyrir bæði agar- og örtítrunarbakkaútfærslurnar af MLA: Meta skal frumueiturhrif með því að nota hlutfallslegan heildarvöxt (RTG) sem Clive og Spector skilgreindu upphaflega árið 1975 (2. heimild). Þessi ráðstöfun nær yfir hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG) (RSG: prófunarrækt á móti samanburði með leysi) meðan frumumeðhöndlun stendur yfir, tjáningartíma og hlutfallslega klónunarhæfni (RCE) (RCE: prófunarrækt á móti samanburði með leysi) þegar stökkbrigðin eru valin (2. heimild). Það skal tekið fram að hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) felur í sér hvers konar frumutap sem verður í prófunarræktinni meðan meðhöndlun stendur yfir (sjá formúlur í 2. viðbæti).

26. Að því er varðar TK6: Meta skal frumueiturhrif með því að nota hlutfallslega lifun (RS), þ.e. klónunarhæfni frumna sem er sáð strax að lokinni meðhöndlun, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun á grundvelli frumutalningar, samanborið við neikvæðan samanburð (með 100% lifun) (sjá formúlur í 2. viðbæti).

27. Meta skal a.m.k. fjóra prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir er hægt að nota annaðhvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Niðurstöður, sem fást úr samhliða ræktunum við tiltekinn styrkleika, skulu tilkynntar sérstaklega en þær er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna (55. heimild). Yfirleitt er hæfilegt að tvö- til þrefalda styrkbilin fyrir prófunaríðefni sem sýna lítil eða engin frumueiturhrif. Ef frumueiturhrif verða skal velja styrkleikana þannig að þeir nái yfir það frumueiturhrifasvið sem veldur frumueiturhrifum, eins og lýst er í 28. lið, og nái yfir styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunaríðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að ná yfir allt svið frumueiturhrifa, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, getur verið nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og fleiri en fjóra styrkleika, einkum við þau skilyrði að endurtekin rannsókn er nauðsynleg (sjá 70. lið). Ef ein rækt er notuð getur verið sérstaklega mikilvægt að nota fleiri en fjóra styrkleika.

28. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% hlutfallslegum heildarvexti (RTG) fyrir MLA og milli 20 og 10% hlutfallslegri lifun (RS) fyrir TK6 (67. liður).

29. Hæsti greindi styrkleiki torleysanlegra prófunaríðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er undir lægstu leysanleikamörkum, 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. Þar eð ræktir í sviflausnum eru notaðar í MLA og TK6 skal gæta sérstaklega að því að tryggja að fellingin trufli ekki framkvæmd prófunarinnar. Það getur einnig verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunarætinu fyrir tilraunina.

30. 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 (57.–58. heimild). Ef prófunaríðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni [þ.e. efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu (UVCB-efni)], 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 (59. heimild).

Samanburðir

31. Fyrir hvert tilraunaskilyrði skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 21. lið), sem byggist á því að meðhöndlunarætið er eingöngu leysir sem fær sömu meðhöndlun og meðhöndluðu ræktirnar.

32. Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina stökkbrigði við þau skilyrði sem tiltekin eru í aðferðarlýsingu prófunarinnar sem er notuð, skilvirkni útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins (ef það á við) og til að sýna fram á fullnægjandi greiningu á bæði litlum/síðframkomnum og miklum/snemmframkomnum *TK*-stökkbrigðum. Dæmi um jákvæðan samanburð eru gefin í töflu 1 hér á eftir. Hægt er að nota önnur jákvæð samanburðarefni ef það er stutt rökum. Þar eð prófanir í glasi á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumur eru nægilega staðlaðar fyrir skammtímameðhöndlun (3–4 klst.) sem gerð er samskeiða, með og án efnaskiptavirkjunar, með sömu lengd meðferðar, má takmarka notkun jákvæðs samanburðar við stökkbreytivald sem krefst efnaskiptavirkjunar. Í því tilviki sýnir þessi eina svörun með jákvæðri samanburðarprófun fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins. Ef langtímameðhöndlun er notuð (þ.e. 24 klst. án S9) skal hún þó 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 og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í þessari prófunaraðferð (sjá 28. lið).

Tafla 1

Viðmiðunarefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði

Flokkur	Efni	CAS-númer
1. Stökkbreytivaldar sem eru virkir án efnaskiptavirkjunar		
	Metýlmetansúlfónat	66-27-3
	Mítómýsín C	50-07-7
	4-nítrókínólín-N-oxíð	56-57-5
2. Stökkbreytivaldar sem þarfnast efnaskiptavirkjunar		
	Bensó(a)pýren	50-32-8
	Sýklófosfamíð(mónóhýdrat)	50-18-0(6055-19-2)
	7,12-dímetýlbensantrasen	57-97-6
	3-metýlkólantren	56-49-5

VERKFERLI

Meðhöndlun með prófunaríðefni

33. Frumur, sem eru í fjölgunarferli, eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu, bæði með efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Beita skal váhrifum í hæfilegan tíma (venjulega eru 3–4 klukkustundir fullnægjandi). Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (59. heimild). Að því er varðar MLA, í tilvikum þar sem skammtíma-meðhöndlun gefur neikvæðar niðurstöður og upplýsingar benda til þess að þörf sé á lengri meðhöndlun (t.d. kirnisleifahliðstæður, torleysanleg íðefni (5. og 59. heimild), skal vega það og meta hvort framkvæma skuli prófunina með lengri meðhöndlun, þ.e. 24 klst. án S9.

34. Lágmarksfjöldi frumna sem er notaður fyrir hverja prófunarræktun (samanburður og meðhöndlun) á hverju stigi prófunarinnar, er ákveðinn með tilliti til tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða. Almenna viðmiðunarreglan er að fjöldi meðhöndlaðra frumna og umsáninga í hverri tilraunarækt sé nógu mikill til að viðhalda a.m.k. 10 en helst 100 sjálfsprottnum stökkbrigðum á öllum stigum prófunarinnar (meðhöndlun, svipfarstjáning og val á stökkbrigðum) (56. heimild).

35. Að því er varðar MLA er ráðlögð, ásættanleg tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða á bilinu 35–140 × 10^{-6} (agarbakkaútfærsla) og 50–170 × 10^{-6} (örtítrunarbakkaútfærsla) (sjá töflu 2). Nauðsynlegt er að meðhöndla a.m.k. 6 × 10^{6} frumur til að fá a.m.k. 10 og helst 100 sjálfsprottin stökkbrigði sem lifa meðhöndlunina af í hverri prófunarrækt. Meðhöndlun á þessum fjölda frumna og viðhald á nægum fjölda frumna meðan tjáning og klónun vegna vals á stökkbrigðum stendur yfir tryggir nægan fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri) á öllum stigum tilraunarinnar, jafnvel fyrir ræktir sem eru meðhöndlaðar með styrkleikum sem valda 90% frumueiturhrifum (sem er mælt með hlutfallslegum heildarvexti (RTG) sem nemur 10%) (19. og 38.–39. heimild).

36. Að því er varðar TK6 er tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða að jafnaði milli 2 og 10 × 10^{-6}. Nauðsynlegt er að meðhöndla a.m.k. 20 × 10^{6} frumur til að fá a.m.k. 10 sjálfsprottin stökkbrigði sem lifa meðhöndlunina af í hverri ræktun. Meðhöndlun á þessum fjölda frumna tryggir nægan fjölda sjálfsprottinna stökkbrigða (10 eða fleiri) jafnvel fyrir ræktirnar sem eru meðhöndlaðar með styrkleikum sem valda 90% frumueiturhrifum meðan meðhöndlun stendur yfir (10% hlutfallsleg lifun (RS)). Auk þess þarf að rækta nægilegan fjölda frumna meðan tjáningartíminn stendur yfir og sá fyrir val á stökkbrigðum (60. heimild).

Svipfarstjáningartími og mæling á frumueiturhrifum og tíðni stökkbrigða

37. Við lok meðhöndlunartímabilsins eru frumurnar ræktaðar í skilgreindan tíma til að svipfarstjáning nýframkallaðra stökkbrigða, sem eru sértækar fyrir hverja frumulínu, verði svo til í hámarki. Að því er varðar MLA er svipfarstjáningartímabilið 2 dagar. Að því er varðar TK6 er svipfarstjáningartímabilið 3–4 dagar. Ef 24 klst. meðhöndlun er notuð hefst tjáningartímabilið eftir lok meðhöndlunar.

38. Meðan svipfarstjáningartímabilið stendur yfir eru frumurnar taldar daglega. Að því er varðar MLA er dagleg frumutalning notuð til að reikna út daglegan svifblönduvöxt (SG). Eftir tveggja daga tjáningartímabilið eru frumurnar settar í æti og útbúin úr þeim svifblanda, með eða án valvísa efnisins, til að ákvarða fjölda stökkbrigða (valbakkar) og klónunarhæfni (lífvænleikabakkar), eftir því sem við á. Að því er varðar MLA eru tvær jafnásættanlegar aðferðir fyrir val á stökkbrigðum til klónunar: í annarri er notaður mjúkur agar og í hinni fljótandi æti í 96 holu bökkum (19. og 38.–39. heimild). Klónun í TK6 er framkvæmd með því að nota fljótandi æti og 96 holu bakka (16. heimild).

39. Tríflúortýmidín (TFT) er eina valvísa efnið sem mælt er með fyrir *TK*-stökkbrigði (61. heimild).

40. Að því er varðar MLA eru agarbakkar og örtítrunarbakkar taldir eftir 10–12 daga ræktun. Að því er varðar TK6 eru þyrpingar í örtítrunarbökkum taldar eftir 10–14 daga m.t.t. snemmframkominna stökkbrigða. Til þess að endurheimta hægvaxandi (síðframkomin) TK6-stökkbrigði er nauðsynlegt að fóðra frumurnar aftur með vaxtaræti og tríflúortýmidíni (TFT) eftir talningu á snemmframkomnum stökkbrigðum og láta bakkana síðan standa í 7–10 daga til viðbótar (62. heimild). Sjá umfjöllun, sem varðar ákvörðun á heildarfjölda hægvaxandi *TK*-stökkbrigða og *TK*-stökkbrigða sem vaxa á eðlilegan hátt, í 42. og 44. lið.

41. Viðeigandi útreikningar fyrir prófanirnar tvær, þ.m.t. aðferðirnar tvær (agar- og örtítrunarbakkar) að því er varðar MLA, eru í 2. viðbæti. Að því er varðar agaraðferðina í MLA eru þyrpingarnar taldar og fjöldi stökkbreyttra þyrpinga aðlagaður með klónunarhæfninni til að reikna út tíðni stökkbrigða (MF). Að því er varðar örtítrunarbakkaútfærsluna af MLA og TK6 er klónunarhæfni, bæði fyrir valbakka og klónunarhæfnibakka, ákvörðuð samkvæmt Poisson-dreifingunni (63. heimild). Tíðni stökkbrigða (MF) er reiknuð út frá þessari tvenns konar klónunarhæfni.

Lýsing á eiginleikum stökkbreyttra þyrpinga

42. Að því er varðar MLA, ef prófunaríðefni gefur jákvæðar niðurstöður (sjá 62.–63. lið), skal gera lýsingu á eiginleikum þyrpingarinnar með því að ákveða stærð þyrpinga eða vöxt a.m.k. í einni af prófunarræktunum (yfirleitt þar sem ásættanlegur jákvæður styrkur er hæstur) og í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum. Ef prófunarefnið gefur neikvæðar niðurstöður (sjá 64. lið) skal gera lýsingu á eiginleikum stökkbreyttra þyrpinga í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum. Að því er varðar örtítrunarbakkaaðferð MLA eru stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar skilgreind sem þau sem ná yfir minna en 25% af þvermáli holunnar og stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar sem þau sem ná yfir meira en 25% af þvermáli holunnar. Að því er varðar agarbakkaaðferðina er notaður sjálfvirkur þyrpingateljari til að telja stökkbreyttar þyrpingar og ákveða stærð þyrpinga. Aðferðum til að ákveða stærð þyrpingar er lýst í heimildunum (19., 38. og 40. heimild). Þörf er á lýsingu á eiginleikum þyrpingar í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum til að sýna fram á að rannsóknirnar séu gerðar á fullnægjandi hátt.

43. Ekki er hægt að ákvarða að prófunaríðefni sé neikvætt ef hvorki stökkbrigði sem mynda litlar þyrpingar né stökkbrigði sem mynda stórar þyrpingar greinast á fullnægjandi hátt í jákvæða samanburðinum. Hægt er að nota lýsingu á eiginleikum þyrpingar til að veita almennar upplýsingar er varða getu prófunaríðefnis til að valda punktbreytingum og/eða atburðum í litningum (4. liður).

44. TK6: Mismunandi ræktunartími (sjá 40. lið) aðgreinir stökkbrigði sem vaxa á eðlilegan hátt og hægvaxandi stökkbrigði. Að því er varðar TK6 eru yfirleitt bæði snemmframkomin og síðframkomin stökkbrigði talin í öllum ræktum, þ.m.t. í neikvæðum og jákvæðum samanburðum. Þörf er á lýsingu á eiginleikum þyrpingar í neikvæðu og jákvæðu samanburðunum til að sýna fram á að rannsóknirnar séu gerðar á fullnægjandi hátt. Ekki er hægt að ákvarða að prófunaríðefni sé neikvætt ef hvorki snemmframkomin né síðframkomin stökkbrigði greinast á fullnægjandi hátt í jákvæða samanburðinum. Hægt er að nota lýsingu á eiginleikum þyrpingar til að veita almennar upplýsingar er varða getu prófunaríðefnis til að valda punktbreytingum og/eða atburðum í litningum (4. liður).

Hæfni rannsóknarstofunnar

45. Rannsóknarstofan skal hafa framkvæmt röð tilrauna með jákvæðum viðmiðunarefnum í mismunandi gangvirkjum (að lágmarki eitt virkt með og eitt virkt án efnaskiptavirkjunar sem eru valin úr efnunum sem eru skráð í töflu 1) og mismunandi neikvæðum samanburðum (þ.m.t. óméðhöndlaðar ræktir og mismunandi leysar/burðarefni) til að sýna fram á að nægileg reynsla sé af prófuninni áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Svaranirnar í þessum jákvæðu og neikvæðu samanburðum skulu vera í samræmi við heimildir. Þessi krafa á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltæka grunna með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 47.–50. lið. Að því er varðar MLA ættu gildin, sem fást fyrir bæði jákvæða og neikvæða samanburði, að vera í samræmi við ráðleggingar IWGT (sjá töflu 2).

46. Kanna skal nokkur valin jákvæð samanburðarefni (sjá töflu 1) með stuttum og löngum meðhöndlununum (ef langar meðhöndlanir eru notaðar) án efnaskiptavirkjunar og einnig með stuttri meðhöndlun að viðbættri efnaskiptavirkjun til að sýna fram á hæfni við greiningu á stökkbreytandi íðefnum, ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og sýna fram á hversu viðeigandi skilyrðin til frumuvaxtar eru meðan á meðhöndlun stendur, við svipfarstjáningu og við val á stökkbrigðum og hversu viðeigandi talningaraðferðirnar eru. Velja skal styrksvið völdu efnanna þannig að það fáist samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

47. Rannsóknarstofan skal ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (óméðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.

48. Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt neikvæð viðmiðunargögn. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburða-dreifingar (64.–65. heimild).

49. 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“ (65. 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 (66. heimild). Nánari upplýsingar og ráðleggingar um hvernig á að byggja upp og nota rannsóknarsöguleg gögn er að finna í heimildunum (64. heimild).

50. Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni stökkbrigða úr stakri rækt eða helst samhliða ræktum, eins og lýst er í 27. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði. Ef gögn um neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknasögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar, að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 49. lið) og það eru engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.

51. Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis gagnanna við fyrirliggjandi rannsóknar-sögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Framsetning niðurstaðna

52. Framsetning gagna fyrir bæði MLA og TK6 skal innihalda, bæði fyrir meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir, gögn sem þarf til að reikna út frumueiturhrif (hlutfallslegan heildarvöxt (RTG) eða hlutfallslega lifun (RS), eftir því sem við á) og tíðni stökkbrigða eins og lýst er hér á eftir.

53. Að því er varðar MLA skal leggja fram gögn um hverja rækt fyrir sig um hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG), hlutfallslegan heildarvöxt (RTG), klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin og fjölda stökkbreyttra þyrpinga (fyrir agarbakkaútfærsluna) eða fjölda tómra hola (fyrir örtítrunarbakkaútfærsluna). Tíðni stökkbrigða (MF) skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna á móti milljón eftirlifandi frumna. Ef svörunin er jákvæð skal gefa upp tíðni stökkbrigða (MF) í litlum og stórum þyrpingum (og/eða hundraðshluta samanlagðrar tíðni stökkbrigða) fyrir a.m.k. einn styrkleika prófunaríðefnisins (yfirleitt hæsta jákvæða styrkinn) og neikvæða og jákvæða samanburði. Ef um er að ræða neikvæða svörun skal gefa upp tíðni stökkbrigða (MF) í litlum og stórum þyrpingum fyrir neikvæða samanburðinn og jákvæða samanburðinn.

54. Að því er varðar TK6 skal leggja fram gögn um hverja rækt fyrir sig um hlutfallslega lifun (RS), klónunarhæfni þegar stökkbrigðin eru valin og fjölda tómra hola fyrir snemmframkomin og síðframkomin stökkbrigði. Tíðni stökkbrigða (MF) skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna af fjölda eftirlifandi frumna og skal innihalda samanlagða tíðni stökkbrigða sem og tíðni stökkbrigða (og/eða hundraðshluta samanlagðrar tíðni stökkbrigða) í snemmframkomnum og síðframkomnum stökkbrigðum.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

55. Að því er varðar bæði MLA og TK6 skulu eftirfarandi viðmiðanir uppfylltar áður en heildarniðurstöður fyrir tiltekið prófunaríðefni eru ákvarðaðar:

— Tvenns konar tilraunaskilyrði (meðhöndlun í skamman tíma með og án efnaskiptavirkjunar, sjá 33. lið) voru notuð nema annað þeirra hafi leitt til jákvæðra niðurstaðna.

— Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika skal vera greinanlegur (sjá 27. og 34.–36. lið).

— Viðmiðanirnar fyrir valinu á hæsta styrkleika eru í samræmi við það sem lýst er í 28.–30. lið.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir neikvæða og jákvæða samanburði

56. Greining MLA-sérfræðingahópsins á vegum IWGT á miklu magni af MLA-gögnum leiddi til alþjóðlegs samkomulags um sértækar viðmiðanir fyrir ásættanleika MLA (1.–5. heimild). Þessi prófunaraðferð felur því í sér tilteknar ráðleggingar að því er varðar að ákvarða ásættanleika neikvæðra og jákvæðra samanburða og að því er varðar að meta einstakar niðurstöður um efni í MLA. TK6 er með mun minni gagnagrunn og hefur ekki verið metin af hálfu vinnuhóps.

57. Að því er varðar MLA skal meta hverja tilraun með tilliti til þess hvort ómeðhöndlaður samanburður/samanburður með leysi uppfyllir viðmiðanir MLA-vinnuhópsins á vegum IWGT um ásættanleika ((4. heimild) og tafla 2 hér á eftir) fyrir: 1) tíðni stökkbrigða (MF) (veita skal því athygli að ásættanleg tíðni stökkbrigða samkvæmt IWGT er mismunandi fyrir agar- og örtítrunarbakkaútfærslurnar af MLA), 2) klónunarhæfni (CE) þegar stökkbrigðin eru valin og 3) svifblönduvöxt (SG) fyrir samanburð með leysi (sjá formúlur í 2. viðbæti).

Tafla 2

Viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir MLA

Mæliþáttur	Aðferð með mjúkum agar	Örtítrunarbakkaaðferð
Tíðni stökkbrigða	$35–140 \times 10^{-6}$	$50–170 \times 10^{-6}$
Klónunarhæfni	65–120%	65–120%
Svifblönduvöxtur (SG)	8–32-faldur (3.–4. klst. meðhöndlun) 32–180-faldur (24. klst. meðhöndlun, ef hún er gerð)	8–32-faldur (3.–4. klst. meðhöndlun) 32–180-faldur (24. klst. meðhöndlun, ef hún er gerð)

58. Í MLA skal einnig meta hverja prófun með tilliti til þess hvort jákvæður samanburður/jákvæðir samanburðir uppfylla a.m.k. aðra af tveimur eftirfarandi viðmiðunum fyrir ásættanleika sem vinnuhópur IWGT þróaði:

— Jákvæður samanburður skal sýna óvefengjanlega aukningu á samanlagðri tíðni stökkbrigða (MF), þ.e. aukningu sem er meiri en tíðni sjálfsprottinna bakgrunnsstökkbrigða [tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF)] sem nemur a.m.k. 300×10^{-6}. Að minnsta kosti 40% af tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF) skulu endurspeglast í tíðni stökkbrigða (MF) í litlu þyrpingunni.

— Jákvæði samanburðurinn sýnir aukningu á tíðni stökkbrigða (MF) í litlu þyrpingunni a.m.k. 150×10^{-6} sem er meiri en sú sem sést í samskeiða ómeðhöndluðum samanburði/samanburði með leysi (tíðni framkallaðra stökkbrigða (IMF) í litlu þyrpingunni nemur 150×10^{-6}).

59. Að því er varðar TK6 telst prófun ásættanleg ef samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 48.–49. lið. Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 32. lið) skulu þar að auki 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.

60. Að því er varðar báðar prófanir skulu efri mörk frumueiturhrifa sem koma fram í jákvæðu samanburðarræktinni vera þau sömu og í tilraunaræktununum. Það er að segja, hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG)/hlutfallsleg lifun (RS) skal ekki vera undir 10%. Það er nóg að nota einn styrkleika (eða einn af styrkleikunum í jákvæðu samanburðarræktunum ef fleiri en einn styrkleiki er notaður) til að sýna fram á að viðmiðanir fyrir ásættanleika fyrir jákvæða samanburðinn hafa verið uppfylltar. Enn fremur verður tíðni stökkbrigða (MF) í jákvæða samanburðinum að vera innan ásættanlegs sviðs sem er fastsett fyrir rannsóknarstofuna.

Mat og túlkun á niðurstöðum

61. Að því er varðar MLA hefur sérfræðingahópurinn á vegum IWGT um eitilæxli músa (e. *The Mouse Lymphoma Expert Workgroup*) (4. heimild) unnið mikilvægt starf varðandi líffræðilegt mikilvægi og viðmiðanir fyrir jákvæða svörun. Þessi prófunaraðferð felur því í sér tilteknar ráðleggingar að því er varðar túlkun á niðurstöðunum um prófunaríðefni úr MLA (sjá 62.–64. lið) TK6 er með mun minni gagnagrunn og hefur ekki verið metin af hálfu vinnuhóps. Ráðleggingarnar að því er varðar túlkunina á gögnunum fyrir TK6 eru því almennari (sjá 65.–66. lið). Viðbótarráðleggingar gilda um báðar prófanirnar (sjá 67.–71. lið)

MLA

62. Mælt er með aðferð til að skilgreina jákvæða og neikvæða svörun til að tryggja að aukin tíðni stökkbrigða (MF) sé líffræðilega mikilvæg. Í stað tölfræðilegrar greiningar, sem er almennt notuð fyrir aðrar prófanir, byggir hún á notkun fyrirframskilgreindrar tíðni framkallaðra stökkbrigða (þ.e. aukningu á tíðni stökkbrigða (MF) yfir samskeiða samanburðinn), sem nefnist altækur matsstuðull (e. *Global Evaluation Factor* (GEF)), sem byggist á greiningu á gögnum frá rannsóknarstofum, sem taka þátt (4. heimild), um dreifingu á tíðni stökkbrigða í neikvæða samanburðinum. Að því er varðar agarbakkaútgáfuna af MLA er altækur matsstuðull (GEF) 90×10^{-6} og að því er varðar örtítrunarbakkaútfærsluna af MLA er altækur matsstuðull (GEF) 126×10^{-6}.

63. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefni talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef aukning á tíðni stökkbrigða (MF) yfir samskeiða bakgrunninn fer yfir altæka matsstuðulinn (GEF)og aukningin er styrktengd (t.d. með notkun leitniprófunar). Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið stökkbreytingu í þessu prófunarkerfi.

64. Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefni talið valda greinilegri neikvæðri svörun við öll tilraunaskilyrðin sem eru skoðuð (sjá 33. lið), ef það er engin styrktengd svörun eða, ef það er aukning á tíðni stökkbrigða (MF), aukningin fer ekki yfir altæka matsstuðulinn (GEF). Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið stökkbreytingar í þessu prófunarkerfi.

TK6

65. 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 33. lið), ef:

— að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— aukningin er styrktengd í mati með viðeigandi leitniprófun (sjá 33. lið),

— einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 48. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið stökkbreytingu í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í heimildum (66.–67. heimild).

66. 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 33. lið), ef:

— enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin styrktengd 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 48. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið stökkbreytingar í þessu prófunarkerfi.

Fyrir bæði MLA og TK6:

67. Ef hámarksstyrkur grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná milli 20 og 10% af hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS)**.** Samkomulag er um að sýna skuli varkárni við túlkun jákvæðra niðurstaðna sem er eingöngu að finna á bilinu 20 og 10% af hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS) og niðurstaða myndi ekki teljast jákvæð ef aukning á tíðni stökkbrigða (MF) á sér einungis stað við eða undir 10% hlutfallslegum heildarvexti (RTG)/hlutfallslegri lifun (RS) (ef það er metið) (2. og 59. heimild).

68. Við vissar kringumstæður geta viðbótarupplýsingar hjálpað til við að ákvarða að prófunaríðefni sé ekki stökkbreytandi ef engin rækt sýnir gildi hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG) á bilinu 10–20% hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG)/hlutfallsleg lifun (RS). Þessum aðstæðum er lýst sem hér segir: 1) það eru engar vísbendingar um stökkbreytandi hrif (t.d. engin tengsl milli skammts og svörunar, tíðni stökkbrigða fer ekki yfir þá tíðni sem sést í samskeiða neikvæðum samanburði eða sögulegu bakgrunnssviði o.s.frv.) í röð gagnapunkta innan 100% til 20% hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) og það er a.m.k. einn gagnapunktur á bilinu 20 til 25% RTG/RS**.** 2) það eru engar vísbendingar um stökkbreytandi hrif (t.d. engin tengsl milli skammts og svörunar, tíðni stökkbrigða fer ekki yfir þá tíðni sem sést í samskeiða neikvæðum samanburði eða sögulegu bakgrunnssviði o.s.frv.) í röð gagnapunkta á bilinu 100% til 25% hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) og það er einnig neikvæður gagnapunktur lítillega undir 10% RTG/RS**.** Við báðar þessar aðstæður má draga þá ályktun að prófunaríðefnið sé neikvætt.

69. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

70. 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 gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði [t.d. styrkleikabil til að auka líkurnar á því að fá gagnapunkta innan 10–20% sviðs hlutfallslegs heildarvaxtar (RTG)/hlutfallslegrar lifunar (RS) önnur skilyrði efnaskiptavirkjunar (þ.e. styrk eða uppruna S9) og lengd meðhöndlunar].

71. Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir. Því er ályktað að svörun prófunaríðefnisins sé tvíræð (túlkuð þannig að hún er jafnlíkleg til að vera jákvæð eða neikvæð).

PRÓFUNARSKÝRSLA

72. 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 ræktunarætinu 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 lokaræktunarætinu.

Frumur:

Fyrir móðurræktir á rannsóknarstofu:

— gerð og uppruni frumna og saga hjá prófunarstofunni,

— einkenni kjarngerðarinnar og/eða eðlilegur fjöldi litninga

— aðferðir til að viðhalda frumuræktum,

— upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum,

— tvöföldunartími frumna.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda frumuræktа sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,

— samsetning ræktunarætis, styrkur CO2, rakastig,

— styrkleiki prófunaríðefnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarætinu (t.d. í µg eða mg/ml eða mM af ræktunaræti),

— styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðefnis sem er bætt í ræktunarætið,

— ræktunarhiti,

— ræktunartími,

— lengd meðhöndlunar,

— þéttleiki frumna við meðferð,

— gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarætinu, gæðaeftirlit með S9),

— jákvæð og neikvæð samanburðarefni, lokastyrkleiki við öll meðhöndlunarskilyrði,

— lengd tjáningartíma (m.a. fjöldi frumna sem er sáð, undirræktir og áætlanir um næringargjöf, ef við á),

— auðkenni valvísa efnisins og styrkleikar þess,

— tilgreina skal útfærslu af MLA sem er notuð (agar- eða örtítrunarbakki),

— viðmiðanir fyrir ásættanleika prófananna,

— aðferðir sem eru notaðar til að finna fjölda lífvænlegra og stökkbreyttra frumna,

— aðferðir sem eru notaðar við mælingar á frumueiturhrifum,

— allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,

— tímalengd ræktunar eftir sáningu,

— skilgreining á þyrpingum þar sem stærð og gerð eru lögð til grundvallar (m.a. viðmiðanir fyrir „litlar“ og „stórar“ þyrpingar, eftir því sem við á),

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,

— aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða sýrustig, osmólalstyrk, ef það er gert, og útfellingu, ef við á.

Niðurstöður:

— fjöldi frumna í hverri rækt sem eru meðhöndlaðar og fjöldi frumna í hverri rækt sem eru afræktaðar,

— mæliþættir fyrir eiturhrif (hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG) fyrir MLA og hlutfallsleg lifun (RS) fyrir TK6),

— merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,

— fjöldi frumna sem er sáð í æti með valvísa efninu og í æti sem er ekki með valvísa efninu,

— fjöldi þyrpinga í ætinu með valvísa efninu og fjöldi þyrpinga í ætinu sem er ekki með valvísa efninu og tengd tíðni stökkbrigða,

— stærð þyrpinga ákveðin í neikvæðum og jákvæðum samanburðum og, ef prófunaríðefnið gefur jákvæða niðurstöðu, í a.m.k. einum styrkleika, og tengd tíðni stökkbrigða,

— tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),

— söguleg gögn um neikvæðan samanburð (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar) með styrkbilum, meðaltali og staðalfrávikum; fjöldi prófana sem sögulegi samanburðurinn byggist á,

— tölfræðilegar greiningar (fyrir stakar ræktir og safnsýni samhliða prófunar, ef við á) og p-gildi, ef þau liggja fyrir, og mat á altækum matsstuðli (GEF) fyrir MLA.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstaða

HEIMILDIR

1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

6) 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.

7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci., 109 (1): 96-105.

10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (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 Res., 634 (1-2): 177-183.

21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Handrit í vinnslu).

38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Í: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (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 Res., 37 (1): 83-90.

46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

47) 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, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65

48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, bls. 85–88.

50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

52) UNEP (2001). Stokkhólmssamningur um þrávirk lífræn efni, Umhverfisstofnun Sameinuðu þjóðanna.

53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Í: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, bls. 91-103.

54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, bls. 66–101.

57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (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 Res., 741 (1-2): 32-56.

58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

59) 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:// www.federalregister.gov/a/2012-13774].

60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

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).

Stökkbreytivaldur sem veldur basaskiptum: Íðefni sem valda því að skipti verða á basapörum í DNA-sameindinni.

Íðefni: Efni eða blanda.

Klónunarhæfni: Hlutfall frumna sem er sáð í litlum þéttleika og geta vaxið til að mynda þyrpingu sem hægt er að telja.

Efni sem veldur litningabrenglun: Öll íðefni eða ferli sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumuhópum eða hópum lífvera.

Frumueiturhrif: Að því er varðar greiningar sem falla undir þessa prófunaraðferð eru frumueiturhrif greind sem minnkun á hlutfallslegum heildarvexti (RTG) eða hlutfallslegri lifun (RS) í MLA og TK6, eftir því sem við á.

Frumstökkbreyting: Genastökkbreyting frá foreldragerð í stökkbrigði sem veldur því að ensímvirkni eða hlutverk táknaða prótínsins breytist eða glatast.

Fasabreytandi efni: Íðefni sem valda því að eitt eða nokkur basapör bætast við í DNA-sameindinni eða falla brott úr henni.

Erfðaeiturhrif: Almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. DNA-rof, viðbætur, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Endurröðun í jafnskiptingu: Meðan frumuskipting stendur yfir verður endurröðun milli samstæðra litningsþráða sem leiðir hugsanlega til vakningar á rofi DNA-tvíþátta eða til taps á arfblendni.

Stökkbreytandi: Veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Tíðni stökkbrigða (MF): Fjöldi stökkbreyttra frumna deilt með fjölda lífvænlegra frumna.

Svipfarstjáningartími: Tíminn sem er liðinn frá meðhöndlun þegar erfðafræðilega breytingin er fest í genamenginu og allar genaafurðir sem fyrir eru hverfa þannig að svipfarseinkennin breytast.

Hlutfallsleg lifun (RS): Hlutfallsleg lifun (RS) er notuð sem mælikvarði á meðhöndlunartengd frumueiturhrif. Hún er hlutfallsleg klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburði.

Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG): Að því er varðar MLA er hlutfallslegur samanlagður svifblönduvöxtur (SG) í tvo daga í prófunarræktinni borinn saman við samanlagðan tveggja daga svifblönduvöxt í neikvæðum samanburði/samanburði með leysi (Clive og Spector, 1975). Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) skal fela í sér hlutfallslegan vöxt prófunarræktarinnar samanborið við neikvæðan samanburð/samanburð með leysi á meðhöndlunartímabilinu.

Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG): Í MLA er hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG) notaður sem mælikvarði á meðhöndlun-artengd frumueiturhrif. Hann er mælikvarði á hlutfallslegan (samanborið við samanburð með burðarefni) vöxt prófunarrækta meðan meðhöndlun stendur yfir, tjáningu í tvo daga og val á stökkbrigðum til klónunar í prófuninni. Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) í hverri prófunarrækt er margfaldaður með hlutfallslegri klónunarhæfni prófunarræktarinnar þegar stökkbrigðin eru valin og tjáður í hlutfalli við klónunarhæfni neikvæðs samanburðar/samanburðar með leysi (Clive og Spector, 1975).

S9-lifrarþættir: 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.

Svifblönduvöxtur (SG) X-föld aukning á fjölda frumna meðan meðhöndlun stendur yfir og tjáningarfasar í MLA. Svifblönduvöxtur (SG) er reiknaður út með því að margfalda x-falda aukningu á degi 1 með x-faldri aukningu á degi 2 fyrir meðhöndlun í skamman tíma (3–4 klst.). Ef 24 klst. meðhöndlun er notuð er svifblönduvöxturinn (SG) x-föld aukning meðan 24 klst. meðhöndlunin stendur yfir margfölduð með x-faldri aukningu á tjáningardegi 1 og 2.

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 ekki 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

Frumueiturhrif

Fyrir báðar útfærslurnar (agar- og örtítrunarbakki) af MLA

Frumueiturhrif eru skilgreind sem hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG), sem felur í sér hlutfallslegan svifblönduvöxt (RSG) á tveggja daga tjáningartímabilinu, og hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) sem fæst þegar stökkbrigðin eru valin. Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG), hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) og hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) eru öll gefin upp sem hundraðshluti.

Útreikningur á hlutfallslegum svifblönduvexti (RSG): Svifblönduvöxtur 1 (SG_1) er vaxtarhraði milli dags 0 og dags 1 (frumustyrkur á degi 1/frumustyrkur á degi 0) og svifblönduvöxtur 2 (SG_2) er vaxtarhraði milli dags 1 og dags 2 (frumustyrkur á degi 2/frumustyrkur á degi 1). Hlutfallslegur svifblönduvöxtur (RSG) er samanlagður svifblönduvöxtur (SG) ($SG_1 \times SG_2$) fyrir meðhöndluðu ræktunina, samanborið við ómeðhöndlaðan samanburð/samanburð með leysi. Þ.e: $RSG = [SG_{1(prófun)} \times SG_{2(prófun)}] / [SG_{1(samanburður)} \times SG_{2(samanburður)}]$ SG_1 skal reiknaður út frá upphaflegum frumustyrk sem er notaður við upphaf frumumeðhöndlunar. Þetta gildir um öll mismunandi frumueiturhrif sem verða í prófunarrækt(um) meðan frumumeðhöndlun stendur yfir.

Hlutfallsleg klónunarhæfni (RCE) er hlutfallsleg klónunarhæfni prófunarræktar, samanborið við hlutfallslega klónunarhæfni ómeðhöndlaðs samanburðar/samanburðar með leysi sem fæst þegar stökkbrigðin eru valin

Hlutfallslegur heildarvöxtur (RTG): RTG=RSG × RCE

TK6

Hlutfallsleg lifun (RS):

Frumueiturhrif eru metin með hlutfallslegri lifun, þ.e. klónunarhæfni (CE) frumna sem er sáð strax að meðhöndlun lokinni, leiðrétt m.t.t. frumutaps í meðhöndlun samanborið við klónunarhæfni í neikvæðum samanburðum (með 100% lifun). Leiðréttingu á frumutapi meðan meðhöndlun stendur yfir er hægt að reikna sem hér segir:

$$Leiðrétt\ klónunarhæfni\ (CE) = CE \times \frac{Fjöldi\ frumna\ í\ lok\ meðhöndlunar}{Fjöldi\ frumna\ við\ upphaf\ meðhöndlunar}$$

Hlutfallsleg lifun (RS*) fyrir rækt sem er meðhöndluð með prófunaríðefni er reiknuð út sem:*

$$RS = \frac{Leiðrétt\ klónunarhæfni\ (CE)\ í\ meðhöndlaðri\ rækt}{Leiðrétt\ klónunarhæfni\ (CE)\ í\ samanburði\ með\ leysi} \times\ 100$$

Tíðni stökkbrigða í bæði MLA og TK6:

Tíðni stökkbrigða (MF) er klónunarhæfni stökkbreyttra þyrpinga í ætinu með valvísa efninu (CE_M), leiðrétt með klónunarhæfninni í ætinu sem er ekki með valvísa efninu þegar stökkbrigðin eru valin (CE_V). Það er, $MF=CE_M/CE_V$. Útreikningi á þessari tvenns konar klónunarhæfni er lýst hér á eftir fyrir klónunaraðferðir í agar- og örtítrunarbakka.

Agarbakkaútfærslan af MLA: *Í útfærslu með mjúkum agar í MLA fæst fjöldi þyrpinga á bakkanum fyrir val á stökkbrigðum (C_M) og fjöldi þyrpinga á bakkanum sem ekki er valið af eða fyrir klónunarhæfnina (líftala) (C_V) með því að telja klónin beint. Þegar 600 frumum er sáð m.t.t. klónunarhæfni (CE) á bakkana fyrir val á stökkbrigðum (CE_M) og á bakkana sem ekki er valið af eða fyrir klónunarhæfnina (líftala) (CE_V) og 3×10^6 frumur eru notaðar til að velja stökkbrigði,*

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Örtítrunarbakkaútfærslan af MLA og TK6: Í örtítrunarbakkaútfærslunni af MLA eru C_M og C_V ákvörðuð sem afurð úr örtítrunarbökkunum samanlagt (TW) og hugsanlegur fjöldi þyrpinga í hverri holu (P) á örtítrunarbökkunum.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Út frá núll-skilyrðinu í Poisson-dreifingunni (Furth et al., 1981) er P gefið upp með

$$P = -\ln (EW / TW)$$

þar sem EW eru tómar holur og TW eru samtals holur. Þar af leiðandi

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Að því er varðar örtítrunarbakkaútfærsluna af MLA er tíðni stökkbrigða sem mynda litlar þyrpingar og stökkbrigða sem mynda stórar þyrpingar reiknuð út á sama hátt og viðeigandi fjöldi af tómum holum notaður fyrir litlar og stórar þyrpingar.

Að því er varðar TK6 er tíðni stökkbrigða sem mynda litlar þyrpingar og stökkbrigða sem mynda stórar þyrpingar byggð á snemmframkomnum og síðframkomnum stökkbrigðum.

B.68 **PRÓFUNARAÐFERÐ *Í GLASI* MEÐ SKAMMVINNUM VÁHRIFUM TIL AÐ GREINA i. ÍÐEFNI SEM KALLA FRAM ALVARLEGAN AUGNSKAÐA OG ii. ÍÐEFNI SEM EKKI ÞURFA FLOKKUN M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 491 um prófanir (2017). Prófunaraðferð með skammvinnum váhrifum (STE-prófunaraðferðin) er aðferð *í glasi* sem hægt er að nota, við tilteknar aðstæður og með tilteknum takmörkunum, til hættuflokkunar og merkingar á íðefnum (efnum og blöndum) sem kalla fram alvarlegan augnskaða sem og á þeim sem hvorki þurfa flokkun m.t.t. alvarlegs augnskaða né augnertingar eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]).

2. Árum saman hefur möguleikinn á hættulegum áhrifum íðefna á augu aðallega verið metinn með því að nota prófun *í lífi* á kanínuaugum (prófunaraðferð B.5 (8. heimild), jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir). Almennt er viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin ein staðgönguprófun *í glasi* komið að öllu leyti í stað prófunar *í lífi* á kanínuaugum til að spá fyrir um öll svörunarsvið alvarlegs augnskaða/augnertingar fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar staðgönguprófunaraðferða, sem eru notaðar innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar, gætu þó komið að öllu leyti í stað prófunar á kanínuaugum (2. heimild). Ofansækin nálgun er hönnuð til prófunar á íðefnum sem búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að hafi mikinn ertingarmátt eða kalli fram alvarlegan augnskaða. Á hinn bóginn er neðansækin nálgun hönnuð til prófunar á íðefnum sem búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að valdi ekki nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun. Þó að ekki sé litið á STE-prófunaraðferðina sem heildarvalkost í stað prófunar *í lífi á* kanínuaugum er hún hentug til notkunar sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun vegna lögbundinnar flokkunar og merkingar, t.d. neðansækin nálgun/ofansækin nálgun, til að greina án frekari prófunar i. íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) og ii. íðefni (að undanskildum mjög rokgjörnum efnum og öllum föstum íðefnum öðrum en yfirborðsvirkum efnum) sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) (1.–2. heimild). Íðefni sem ekki er spáð að valdi alvarlegum augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) eða er utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (kallar hvorki fram alvarlegan augnskaða né augnertingu) með STE-prófunaraðferðinni myndi þó þurfa viðbótarprófun til að ákveða endanlega flokkun. Enn fremur ætti að hafa samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en STE-prófunaraðferðin er notuð í neðansækinni nálgun samkvæmt öðrum flokkunarkerfum en HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun. Val á prófunaraðferð sem á best við og notkun á þessari prófunaraðferð skal skoða í tengslum við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation“ (14. heimild).

3. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðum sem eru notaðar til að meta möguleikann á hættulegum áhrifum prófunaríðefnis á augu, byggt á getu þess til að kalla fram frumueiturhrif í prófunaraðferð með skammvinnum váhrifum. Frumueitrandi áhrif íðefna á frumur úr glæruþekju er mikilvægur verkunarháttur sem leiðir til skemmda á glæruþekjunni og augnertingar. Lífvænleiki frumna í STE-prófunaraðferðinni er metinn, eftir útdrátt úr frumunum, með megindlegri mælingu á bláu formasansalti sem lifandi frumur framleiða með umbreytingu með ensímum á líflitnum MTT (3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl-)2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð), einnig þekktur sem þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð (3. heimild). Lífvænleiki frumna sem fæst er borinn saman við samanburð með leysi (hlutfallslegur lífvænleiki) og notaður til að meta möguleikann á að prófunaríðefni sé hættulegt fyrir augu. Prófunaríðefni er flokkað í 1. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun þegar styrkleikarnir 5% og 0,05% leiða báðir til lífvænleika frumna sem er minni en eða jafn og (≤) 70%. Á hinn bóginn er því spáð að íðefni sé utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun þegar báðir styrkleikarnir 5% og 0,05% leiða til lífvænleika frumna sem er yfir (>) 70%.

4. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem er prófað og tengist ekki nothæfi STE-prófunaraðferðarinnar til prófunar á efnum og/eða blöndum. Skilgreiningar eru gefnar upp í viðbætinum.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

5. Þessi prófunaraðferð byggist á aðferðarlýsingu, sem Kao Corporation (4. heimild) þróaði, sem fór í gegnum tvær mismunandi fullgildingarrannsóknir: aðra hjá *Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments* (fullgildingarnefnd japönsku samtakanna um annars konar aðferðir en tilraunir á dýrum (JSAAE)) (5. 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. EB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

og hina hjá *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (japanska miðstöðin um fullgildingu staðgönguaðferða) (JaCVAM) (6. heimild). NTP samræmingarstofnunin fyrir mat á eiturefnafræðilegum staðgönguaðferðum (NICEATM) og samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) framkvæmdu jafningjarýni á fullgildingarrannsóknarskýrslum og bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar á prófunaraðferðinni (7. heimild).

6. Þegar STE-prófunaraðferðin var notuð til að greina íðefni (efni og blöndur) sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) (1. heimild) sýndu gögn sem fengust með aðferðinni um 125 íðefni (þ.m.t. bæði efni og blöndur) heildarnákvæmni sem nemur 83% (104/125), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna sem nemur 1% (1/86) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem nemur 51% (20/39), samanborið við prófun *í lífi* á kanínuaugum (7. heimild). Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem fékkst er ekki mikilvægt í núverandi samhengi vegna þess að öll prófunaríðefni, sem kalla fram lífvænleika frumna sem nemur ≤ 70% við 5% styrk og > 70% við 0,05% styrk, myndu því næst verða prófuð með öðrum tilhlýðilega fullgiltum aðferðum til prófunar *í glasi* eða, sem síðasta valkost, með prófun *í lífi* á kanínuaugum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum og í samræmi við raðprófunaráætlun og aðferðir með vægi rökstuddra vísbendinga sem er sem stendur mælt með (1. og 8. heimild). Aðallega voru prófuð efni með einum efnisþætti en þó er einnig til takmarkað magn gagna um prófanir á blöndum. 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. STE-prófunaraðferðin sýndi ekki aðra sértæka annmarka þegar hún var notuð til að greina hvort prófunaríðefni tilheyrðu 1. undirflokki HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Rannsakendur geta íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir prófunaríðefni og þá skal lífvænleiki frumna sem nemur ≤ 70% við bæði 5% og 0,05% styrk samþykktur sem vísbending um svörun sem kallar fram alvarlegan augnskaða sem ætti að flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun án frekari prófana.

7. Þegar STE-prófunaraðferðin var notuð til að greina íðefni (efni og blöndur) sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar og alvarlegs augnskaða (þ.e. utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) sýndu gögn, sem fengust með aðferðinni, um 130 íðefni (þ.m.t. bæði efni og blöndur) heildarnákvæmni sem nemur 85% (110/130), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 12% (9/73) og hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 19% (11/57) samanborið við prófun *í lífi* á kanínaugum (7. heimild). Ef mjög rokgjörn efni og föst efni, önnur en yfirborðsvirk efni, eru útilokuð úr gagnasafninu eykst heildarnákvæmnin í 90% (92/102), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna í 2% (1/54) og hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna í 19% (9/48) (7. heimild). Af því leiðir að mögulegur ágalli á STE-prófunaraðferðinni, þegar hún er notuð til að greina prófunaríðefni sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar og alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun), er hátt hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna fyrir i. mjög rokgjörn efni með gufuþrýsting yfir 6 kPa og ii. föst íðefni (efni og blöndur), önnur en yfirborðsvirk efni og blöndur sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnum. Slík íðefni eru útilokuð frá notkunarsviði STE-prófunaraðferðarinnar (7. heimild).

8. Til viðbótar við íðefnin sem getið er í 6. og 7. lið inniheldur gagnasafnið, sem var aflað með STE-prófunaraðferðinni, einnig innanhússgögn um 40 blöndur sem sýndu, samanborið við Draize-augnprófunina *í lífi*, nákvæmni sem nemur 88% (35/40), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 50% (5/10), og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 0% (0/30) við að spá fyrir um blöndur sem þurfa ekki flokkun samkvæmt flokkunarkerfum HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (9. heimild). Þess vegna er hægt að nota STE-prófunaraðferðina til að greina blöndur sem utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun með neðansækinni nálgun, að undanskildum öðrum föstum blöndum en þeim sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnum af því að hún hentar ekki fyrir föst efni. Enn fremur skal meta blöndur, sem innihalda efni með gufuþrýsting yfir 6kPa, af varfærni til að komast hjá mögulegu vanmati og slíkt skal rökstutt í hverju tilviki fyrir sig.

9. Það er ekki unnt að nota STE-prófunaraðferðina til að greina prófunaríðefni sem efni í 2. undirflokki HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun eða í undirflokki 2A (augnerting) eða 2B (væg augnerting) í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun vegna verulegs fjölda íðefna í 1. undirflokki HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun sem hafa verið vanmetin í 2. undirflokk, undirflokk 2A eða undirflokk 2B og íðefni utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun sem voru ofmetin sem efni í 2. undirflokki, undirflokki 2A eða undirflokki 2B (7. heimild). Í þessum tilgangi getur verið nauðsynlegt að gera frekari prófanir með annarri hentugri aðferð.

10. STE-prófunaraðferðin er hentug fyrir prófunaríðefni sem leysast upp eða mynda jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í lífeðlisfræðilegri saltlausn, 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn eða jarðolíu. STE-prófunaraðferðin hentar ekki fyrir prófunaríðefni sem eru óleysanleg eða geta ekki myndað jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í lífeðlisfræðilegri saltlausn, 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn eða jarðolíu. Notkun jarðolíu í STE-prófunaraðferðinni er möguleg vegna þess að váhrifin standa í skamman tíma. Af þessum sökum hentar STE-prófunaraðferðin til að spá fyrir um möguleikann á hættulegum áhrifum vatnsóleysanlegra prófunaríðefna á augu (t.d. langra fitualkóhóla eða ketóna) að því tilskildu að þau séu blandanleg í a.m.k. einum af leysunum þremur sem lagðir eru til hér að framan (4. heimild).

11. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa ([1]) og tengist ekki nothæfi STE-prófunaraðferðarinnar til prófunar á efnum og/eða blöndum.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

12. STE-prófunaraðferðin er greining *í glasi*, sem byggist á frumueiturhrifum, sem er gerð á samfelldu einlagi af glærufrumum úr kanínum (SIRC) frá Statens Seruminstitut sem eru ræktaðar í 96 holu örbakka úr pólýkarbónati (4. heimild). Eftir 5 mínútna váhrif frá prófunaríðefni eru frumueiturhrifin mæld megindlega sem hlutfallslegur lífvænleiki SIRC-frumna með því að nota MTT-greiningu (4. heimild). Minnkandi lífvænleiki frumna er notaður til að spá fyrir um möguleikann á skaðlegum áhrifum sem leiða til augnskemmda.

13. Greint hefur verið frá að 80% af lausn, sem er látin drjúpa í auga kanínu, skiljist út gegnum tárupokann innan þriggja til fjögurra mínútna en meira en 80% af lausn, sem er látin drjúpa í mannsauga, skilst út innan einnar mínútu eða tveggja mínútna (10. heimild). Með STE-prófunaraðferðinni er leitast við að áætla þessa váhrifatíma og eru frumueiturhrif notuð sem endapunktur til að meta umfang skemmda á SIRC-frumum í kjölfar váhrifa frá prófunaríðefni í 5 mínútur.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

14. Áður en STE-prófunaraðferðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að flokka með réttum hætti hæfnisefnin ellefu sem mælt er með í töflu 1. Þessi efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið alvarlegs augnskaða eða alvarlegrar augnertingar, byggt á niðurstöðum úr prófunum *í lífi* á kanínuaugum (viðmiðunarregla 405 um prófanir) og flokkunarkerfi HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild). Aðrar valviðmiðanir voru m.a. þær að efnin fengjust á almennum markaði, að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir *í lífi* væru fáanleg og að hágæðagögn um rannsóknir *í glasi* með STE-prófunaraðferðinni væru fáanleg. Ef efni á skránni fæst ekki, eða þegar slíkt er réttlætanlegt, er hægt að nota annað efni, sem fullnægjandi tilvísunargögn *í lífi* og *í glasi* eru tiltæk um, að því tilskildu að notaðar séu sömu viðmiðanir og hér er lýst.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisefni

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur ([1])	Eðlisástand	*Í lífi* undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun ([2])	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
Bensalkóníumklóríð (10% vatnskennt)	8 001-54-5	Óníumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur

([1]) Á sameiginlegum fundi í júní 2013 var einhugur um að nú ætti að beita samræmdari notkun á hugtakinu „prófunaríðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum prófunaraðferðum til að lýsa því sem er prófað.

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur ([1])	Eðlisástand	*Í lífi* undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun ([2])	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
Triton X-100 (100%)	9 002-93-1	Eter	Vökvi	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur
Acid Red 92	18 472-87-2	Heturhringliða samband, bróm-samband, klór-samband	Fast efni	1. undirflokkur	Saltlausn	1. undirflokkur
Natríumhýdroxíð	1 310-73-2	Basi, ólífrænt efni	Fast efni	1. undirflokkur ([3])	Saltlausn	1. undirflokkur
Bútýrólaktón	96-48-0	Laktón, heturhringliða samband	Vökvi	Undirflokkur 2A (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Saltlausn	Ekki er hægt að setja fram spá
1-oktanól	111-87-5	Alkóhól	Vökvi	Undirflokkur 2A/B ([4]) (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Jarðolía	Ekki er hægt að setja fram spá
Sýklópentanól	96-41-3	Alkóhól, vetniskolefni, hringað	Vökvi	Undirflokkur 2A/B ([5]) (2. undirflokkur í reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun)	Saltlausn	Ekki er hægt að setja fram spá
2-etoxýetýlasetat	111-15-9	Alkóhól, eter	Vökvi	Utan flokks	Saltlausn	Utan flokks
Dódekan	112-40-3	Vetniskolefni, keðjulaga	Vökvi	Utan flokks	Jarðolía	Utan flokks
Metýlísóbútýlketón	108-10-1	Ketón	Vökvi	Utan flokks	Jarðolía	Utan flokks

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur (1)	Eðlisástand	*Í lífi* undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (2)	Leysir í STE-prófun	STE undirfl. HSK SÞ/ reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun
1,1-dímetýlgúanidíns-úlfat	598-65-2	Amidín, brenn-isteinssamband	Fast efni	Utan flokks	Saltlausn	Utan flokks

(1) Skipað var í íðefnaflokka með því að nota upplýsingar sem fengust úr áður útgefnu efni NICEATM og, ef það var ekki fáanlegt, með því að nota „National Library of Medicine's Medical Subject Headings“ (MeSH®) (fyrir milligöngu ChemIDplus® [National Library of Medicine], aðgengilegt á http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) og uppbyggingu sem NICEATM ákvarðaði.

(2) Byggt á niðurstöðum úr prófun *í lífi* á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) og notkun HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild).

(3) Flokkun í 1. undirflokk byggist á húðætingarmætti 100% natríumhýdroxíðs (skráð sem hæfnisíðefni með húðætingarmátt í OECD-viðmiðunarreglu 435 um prófanir) og viðmiðun fyrir 1. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild).

(4) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SÞ til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þurfa tvö dýr af sex á móti fjórum dýrum af sex að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Gagnasafnið *í lífi* hafði að geyma tvær rannsóknir með þremur dýrum í hvorri um sig. Í annarri rannsókninni komu fram áhrif hjá tveimur dýrum af þremur á 7. degi sem gaf tilefni til flokkunar í undirflokk 2A (11. heimild) en í hinni rannsókninni sýndu allir endapunktar bata að stigi núll á sjöunda degi sem gaf tilefni til flokkunar í undirflokk 2B (12. heimild).

(5) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SÞ til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þarf eitt dýr af þremur á móti tveimur dýrum af þremur að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn *í lífi* eru notuð þrjú dýr. Allir endapunktar, fyrir utan ógagnsæi glæru og 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 ógagnsæi glæru svo nam einu stigi og roða í slímhimnu sem nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á fjórtánda degi (11. heimild).

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

VERKFERLI

Tilreiðsla einlagsins af frumum

15. Nota skal SIRC, frumulínu úr glæru úr kanínum, til að framkvæma STE-prófunaraðferðina. Mælt er með því að SIRC-frumur séu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection CCL60“.

16. SIRC-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring í ræktunarflösku sem inniheldur ræktunaræti sem samanstendur af lágmarksæti Eagles (e. *Eagle's minimum essential medium* (MEM)) með viðbættu 10% af nautgripafóstursermi, 2 mM af L-glútamíni, 50–100 einingum/ml af penisillíni og 50–100 µg/ml af streptómýsíni. Aðskilja skal samfestar frumur í ræktunarflöskunni með því að nota trypsínetýlendíamíntetraediksýrulausn, með eða án notkunar á frumusköfu. Frumur eru látnar fjölga sér (t.d. 2 til 3 umsáningar) í ræktunarflösku áður en þær eru notaðar í venjubundnar prófanir og skal ekki umsáð oftar en 25 sinnum eftir afþíðingu.

17. Frumur, sem eru tilbúnar til notkunar í STE-prófun, eru síðan undirbúnar með viðeigandi þéttleika og sáð í 96 holu bakka. Ráðlagður sáningarþéttleiki frumna er $6{,}0 \times 10^3$ frumur í hverri holu þegar frumurnar eru notaðar fjórum dögum eftir sáningu eða $3{,}0 \times 10^3$ frumur þegar frumurnar eru notaðar fimm dögum eftir sáningu með rúmmál ræktа sem nemur 200 µl. Frumur, sem eru notaðar í STE-prófun og er sáð í ræktunaræti með viðeigandi þéttleika, munu ekki ná meiri samfellu en 80% þegar prófun er gerð, þ.e. fjórum eða fimm dögum eftir sáningu.

Prófunaríðefni og samanburðarefni borin á

18. Fyrsta val á leysi til að leysa upp eða útbúa svifblöndu úr prófunaríðefni er lífeðlisfræðileg saltlausn. Ef prófunaríðefni sýnir litla leysni eða ef ekki er hægt að leysa það upp eða það myndar ekki jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í saltlausn er notað 5% dímetýlsúlfoxíð (CAS-númer 67-68-5) í saltlausn sem annað val á leysi. Að því er varðar prófunaríðefni sem er ekki hægt að leysa upp eða það myndar ekki jafna svifblöndu í a.m.k. 5 mínútur í annaðhvort saltlausn eða 5% dímetýlsúlfoxíði í saltlausn er jarðolía (CAS-númer 8 042-47-5) notuð sem þriðja val á leysi.

19. Prófunaríðefni eru leyst upp eða útbúin jöfn svifblanda í völdum leysi við styrk sem nemur 5% (massahlutfall) og þynnt enn frekar, tífalt með raðþynningu, í 0,5% og 0,05% styrk. Hvert prófunaríðefni skal prófað bæði í 5% og 0,05% styrk. Frumur, sem eru ræktaðar í 96 holu bakka, eru látnar verða fyrir váhrifum frá 200 µl/holu af annaðhvort 5% eða 0,05% styrk prófunaríðefnislausnar (eða sviflausn) í fimm mínútur við stofuhita. Prófunaríðefni (efni með einum efnisþætti eða fjölþáttaefni eða blöndur) teljast vera óblönduð efni og eru þynnt eða svifblanda útbúin samkvæmt aðferðinni, óháð hreinleika þeirra.

20. Ræktunarætið, sem lýst er í 16. lið, er notað sem samanburður með æti í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Enn fremur á einnig að láta frumurnar verða fyrir váhrifum frá sýnum með samanburði með leysi í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Staðfest hefur verið að leysarnir, sem eru tilgreindir í 18. lið, hafa engin skaðleg áhrif á lífvænleika SIRC-frumna.

21. Í STE-prófunaraðferðinni á að nota 0,01% natríumlárýlsúlfat í saltlausn sem jákvæðan samanburð í hverjum bakka í hverri endurtekningu. Til að reikna út lífvænleika frumna í jákvæða samanburðinum verður hver bakki í hverri endurtekningu einnig að innihalda leysissamanburð með saltlausn.

22. Blanksýni er nauðsynlegt til að ákvarða uppbót fyrir ljósþéttni og skal prófað í holum sem innihalda einungis fosfatstillta saltlausn en hvorki kalsíum og magnesíum né frumur.

23. Hvert sýni (prófunaríðefni við 5% og 0,05%, samanburður með æti, samanburður með leysi og jákvæður samanburður) skal prófað í þremur settum í hverri endurtekningu með því að láta frumurnar verða fyrir váhrifum í 200 µl af viðeigandi prófunar- eða samanburðaríðefni í 5 mínútur við stofuhita.

24. Viðmiðunarefni eru gagnleg til að meta augnertingarmátt óþekktra íðefna í tilgreindum íðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörunarsviði.

Mæling á lífvænleika frumna

25. Eftir váhrif eru frumurnar skolaðar tvisvar með 200 µl af fosfatstilltri saltlausn og 200 µl af MTT-lausn (0,5 mg MTT/ml af ræktunaræti) er bætt við. Eftir tveggja klst. hvarftíma í hitakassa (37 °C, 5% koltvísýringur) er MTT-lausninni hellt af, MTT-formasan dregið út með því að bæta við 200 µl af 0,04 N saltsýru-ísóprópanóli í 60 mín í myrkri við stofuhita og gleypni MTT-formasanlausnarinnar mæld með bakkalesara við 570 nm. Prófunaríðefnin trufla MTT-greininguna (með litgjöfum eða beinum afoxurum MTT-litar) einungis ef marktækt magn prófunaríðefnis verður eftir í prófunarkerfinu eftir skolun eftir váhrif, sem er tilfellið þegar um er að ræða þrívíða endurgerða glæru úr mönnum eða endurgerða húðvefi manns, en skiptir ekki máli fyrir tvívíðar frumuræktir sem eru notaðar í STE-prófunaraðferðinni.

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

26. Ljósþéttnigildin, sem fást með hverju prófunaríðefni, eru síðan notuð til að reikna út lífvænleika frumna í samanburði við samanburðinn með leysinum sem er fastsettur við 100%. Hlutfallslegur lífvænleiki frumna er gefinn upp sem hundraðshluti og fæst með því að deila í ljósþéttnigildi prófunaríðefnis með ljósþéttigildni samanburðar með leysi eftir að ljósþéttnigildi blanksýnis hefur verið dregið frá báðum gildunum.

$$Lífvænleiki\ frumna(\%) = \frac{\left(Ljósþéttni_{570}\ prófunaríðefnis\right) - \left(Ljósþéttni_{570}\ blanksýnis\right)}{\left(Ljósþéttni_{570}\ samanburðar\ með\ leysi\right) - \left(Ljósþéttni_{570}\ blanksýnis\right)} \times\ 100$$

Á sama hátt er hlutfallslegur lífvænleiki frumna í hverjum samanburði með leysi gefinn upp sem hundraðshluti og fæst með því að deila í ljósþéttnigildi hvers samanburðar með leysi með ljósþéttnigildi samanburðar með æti eftir að ljósþéttnigildi blanksýnis hefur verið dregið frá báðum gildunum.

27. Framkvæma skal þrjár óháðar endurtekningar sem hver um sig inniheldur samhliða prófun í þremur holum (þ.e. n = 9). Meðaltalið úr holunum þremur fyrir hvert prófunaríðefni og samanburð með leysi í sérhverri óháðri endurtekningu er notað til að reikna út meðaltal hlutfallslegs lífvænleika frumna. Lokameðaltal lífvænleika frumna er reiknað út frá óháðu endurtekningunum þremur.

28. Þröskuldsgildi lífvænleika frumna fyrir greiningu á prófunaríðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun) og prófunaríðefnum sem þurfa ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) eru gefin upp hér á eftir.

Tafla 2

Spálíkan fyrir STE-prófunaraðferðina

Lífvænleiki frumna		Flokkun samkvæmt HSK/SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun	Gildissvið
Við 5%	Við 0,05%		
> 70%	> 70%	Utan flokks	Efni og blöndur, að undanskildum i. mjög rokgjörnum efnum með gufuþrýsting yfir 6 kPa (1) og ii. föst íðefni (efni og blöndur) önnur en yfirborðsvirk efni og blöndur sem samanstanda einungis af yfirborðsvirkum efnum
≤ 70%	> 70%	Ekki er hægt að setja fram spá	Á ekki við
≤ 70%	≤ 70%	1. undirflokkur	Efni og blöndur (2)

(1) Meta skal blöndur, sem innihalda efni með gufuþrýsting yfir 6kPa, af varfærni til að komast hjá mögulegu vanmati og slíkt skal rökstutt í hverju tilviki fyrir sig.

(2) Byggt á niðurstöðum sem fengust aðallega með efnum með einum efnisþætti en þó er einnig til takmarkað magn af gögnum um prófanir á blöndum. 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 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.

Samþykktarviðmiðanir

29. Prófunarniðurstöður teljast vera ásættanlegar þegar allar eftirfarandi viðmiðanir eru uppfylltar:

a) Ljósþéttni samanburðar með æti (váhrif frá ræktunaræti) skal vera 0,3 eða hærri eftir að ljósþéttni blanksýnis hefur verið dregin frá.

b) Lífvænleiki samanburðar með leysi skal vera 80% eða hærri í samanburði við samanburð með æti. Ef margir samanburðir með leysi eru notaðir í hverri endurtekningu skal hver þessara samanburða sýna lífvænleika frumna sem er yfir 80% til að prófunaríðefnin sem eru prófuð með þessum leysum uppfylli skilyrðin.

c) Lífvænleiki frumna, sem fæst með jákvæðum samanburði (0,01% natríumlárýlsúlfat), skal vera innan tveggja staðalfrávika frá sögulegu meðaltali. Uppfæra skal efri og neðri samþykkismörk fyrir jákvæða samanburðinn oft, þ.e. 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). Ef rannsóknarstofa lýkur ekki við nægilegan fjölda tilrauna til að staðfesta tölfræðilega sterka dreifingu jákvæða samanburðarins er ásættanlegt að nota efri og neðri samþykkismörkin sem hönnuður aðferðarinnar fastsetti, þ.e. á bilinu 21,1% til 62,3% samkvæmt rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar, meðan verið er að byggja upp innri dreifingu meðan fyrstu venjubundnu prófanirnar standa yfir.

d) Staðalfrávik fyrir endanlegan lífvænleika frumna, leitt út frá þremur óháðum endurtekningum, skal vera undir 15% bæði fyrir 5% og 0,05% styrkleika prófunaríðefnisins.

Ef ein þessara viðmiðana eða nokkrar þeirra eru ekki uppfylltar skal ekki nota niðurstöðurnar og framkvæma skal aðrar þrjár óháðar endurtekningar.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

30. Greint er frá gögnum um hverja holu fyrir sig (t.d. gildi fyrir lífvænleika frumna) fyrir hverja samhliða prófun sem og heildarmeðaltali, staðalfráviki og flokkun.

Prófunarskýrsla

31. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni og samanburðarefni

— Efni með einum efnisþætti: efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda: Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.

— Eðlisástand, rokgirni, sýrustig, LogP, sameindaþyngd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, 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).

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

Skilyrði fyrir prófunaraðferðina og verkferli

— Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

— Lýsing á prófunaraðferðinni sem er notuð.

— Frumulína sem er notuð, uppruni hennar, sáningarnúmer og samfella frumna sem eru notaðar í prófunina.

— Upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð.

— Fjöldi endurtekninga og samskonar sýna sem eru notuð.

— Styrkleikar prófunaríðefna sem eru notaðir (ef frábrugðnir því sem mælt er með).

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi fyrir hvert prófunaríðefni.

— Tímalengd váhrifa frá prófunaríðefninu (ef frábrugðin þeirri sem mælt er með).

— Lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

— Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegt meðaltal fyrir jákvæðan samanburð og staðalfrávik:

— Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunaraðferðina (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða sýnt fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunaraðferðarinnar yfir lengri tíma.

Niðurstöður

— Að því er varðar hvert prófunaríðefni og samanburðarefni og hvern prófaðan styrkleika skal setja einstök ljósþéttnigildi í hverri holu fyrir samhliða prófun, meðaltal ljósþéttnigilda fyrir hverja óháða endurtekningu, lífvænleika frumna í % fyrir hverja óháða endurtekningu og lokameðaltal fyrir lífvænleika frumna í % og staðalfrávik fyrir endurtekningarnar þrjár upp í töfluformi.

— Niðurstöður fyrir æti, leysi og jákvæðan samanburð þar sem sýnt er fram á viðeigandi viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar.

— Lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.

— Afleidd flokkun í heild sinni með tilvísun í spálíkanið/ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstöður

HEIMILDIR

1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-1170 06-1. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2) 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.

3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

4) Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. Toxicol. In Vitro 22,760-770.

5) Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. Toxicol. In Vitro 25,796-809.

6) Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. Toxicol. In Vitro 27, bls.1 855-1 869.

7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Aðgengilegt á: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

8) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting.

9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. J. Pharm. Sci.1 648-1 653.

11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl Toxicol. 18, 442–449.

13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (13. heimild).

Viðmiðunarefni: Efni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunaríðefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleitan og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn (e. *class of substances*) 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 prófunaríðefni 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.

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/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun

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 kemst í snertingu við það efni.

Samanburður með æti: 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.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

Efni með einum efnisþætti: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

MTT: 3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

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.

OD: Ljósþéttni.

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 (10. 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 samanburðar-nákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (13. heimild).

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 (10. heimild).

Alvarlegur augnskaði: 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. Jafngildir „afturhverf áhrif á augu“ og 1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun

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 samanburðarsýni með æti 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 mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (13. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Yfirborðsvirkt efni: Íðefni, 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.

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.

Ofansækin nálgun: þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir prófunaríðefni 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).

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. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (1. heimild).

1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun: Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

2. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun: Sjá „Augnerting“.

Utan flokks í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun: Íðefni sem eru ekki flokkuð sem 1. eða 2. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (eða sem undirflokkur 2A eða undirflokkur 2B í HSK SÞ).

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

B.69. **PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI ÞEKJU SEM LÍKIST GLÆRU ÚR MÖNNUM (RhCE) TIL AÐ GREINA ÍÐEFNI SEM EKKI ÞURFA FLOKKUN OG MERKINGU M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 492 um prófanir (2017). *Alvarlegur augnskaði* er vefjaskemmd í auga eða alvarleg sjónskerðing sem kemur fram eftir að prófunaríðefni er borið á framflöt augans, sem gengur ekki til baka innan 21 dags frá því að það er borið á, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK)] (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun) ([1]). Einnig samkvæmt HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun er *augnerting* breytingar í auga, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á. Prófunaríðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða eru flokkuð í 1. undirflokk HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun en þau sem kalla fram augnertingu eru flokkuð í 2. undirflokk HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. 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 og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (2A eða 2B), þ.e. vísað til þeirra sem utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun.

2. Mat á alvarlegum augnskaða/augnertingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (prófunaraðferð B.5 (2. heimild)). Val á prófunaraðferð sem á best við og notkun á þessari prófunaraðferð skal skoða í tengslum við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation“ (39. heimild).

3. Í þessari prófunaraðferð er lýst aðferð *í glasi* sem gerir það kleift að sanngreina íðefni (efni og blöndur) sem ekki þurfa flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða í samræmi við HSK SÞ og reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun. Þar er notuð endurgerð þekja sem líkist glæru úr mönnum (RhCE) sem líkir nákvæmlega eftir vefjafræðilegum, formfræðilegum, lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum glæruþekju úr mönnum. Fjórar aðrar prófunaraðferðir *í glasi* hafa verið fullgiltar, taldar vísindalega traustar og samþykktar sem prófunaraðferðir B.47 (3. heimild), B.48 (4. heimild), B.61 (5. heimild) og B.68 (6. heimild).

4. Þessi prófunaraðferð nær yfir tvær fullgiltar prófanir þar sem notuð eru RhCE-líkön sem eru fáanleg á almennum markaði. Fullgildingarrannsóknir til að meta augnertingu/alvarlegan augnskaða (7.–13. heimild) hafa verið framkvæmdar með því að nota EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) og SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Í hvorri prófun um sig eru notuð RhCE-vefjalíkön, sem fást á almennum markaði, sem prófunarkerfi og vísað er til þeirra í eftirfarandi texta sem fullgiltu viðmiðunaraðferðanna (VRM) – annars vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM 1) og hins vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2). Út frá þessum fullgildingarrannsóknum og óháðri jafningjarýni á þeim (9. og 12. heimild) var komist að þeirri niðurstöðu að EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT geti greint rétt íðefni (bæði efni og blöndur) sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt HSK SÞ og mælt var með prófununum sem vísindalega gildum í þeim tilgangi (13. heimild).

5. Nú er almennt viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin ein aðferð til augnertingarprófunar *í glasi* komið að öllu leyti í stað Draize-augnprófunarinnar *í lífi* (2. og 14. heimild) til að spá fyrir um öll svörunarsvið alvarlegs augnskaða/augnertingar fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar nokkurra staðgönguprófunaraðferða innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar, s.s. neðansækin nálgun/ofansækin nálgun, gætu þó komið að öllu leyti í stað Draize-augnprófunarinnar (15. heimild). Neðansækin nálgun (15. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi ekki nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun en ofansækin nálgun (15. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi alvarlegum augnskaða. Mælt er með EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT til að greina íðefni, sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (utan flokks), án frekari prófunar innan prófunaráætlunar á borð við neðansækna nálgun/ofansækna nálgun sem Scott *et al.* lögðu til, t.d. sem fyrsta stig í neðansækinni nálgun eða sem eitt af síðustu stigunum í ofansækinni nálgun (15. heimild). Þó er EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT ekki ætlað að greina á milli 1. undirflokks (alvarlegur

([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).

augnskaði) HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun og 2. undirflokks (augnerting) HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Þessa aðgreiningu þarf að fjalla um í öðru aðferðarþrepi prófunaráætlunar (15. heimild). Prófunaríðefni sem reynist þurfa flokkun m.t.t. augnertingar/alvarlegs augnskaða með EpiOcular™ EIT eða SkinEthic™ HCE EIT mun því þurfa viðbótarprófanir (*í glasi* og/eða *í lífi*) til að endanleg niðurstaða náist (utan flokks, 2. undirflokkur eða 1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun), t.d. með því að nota prófunaraðferð B.47, B.48, B.61 eða B.68.

6. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferð sem er notuð til að meta möguleikann á að prófunaríðefni sé hættulegt fyrir augu, byggt á getu þess til að kalla fram frumueiturhrif í RhCE-vefjalíkani eins og þau mælast með MTT-greiningunni (16. heimild) (sjá 21. lið). Lífvænleiki RhCE-vefjar eftir váhrif frá prófunaríðefni er ákvarðaður með samanburði við vef sem er meðhöndlaður með neikvæðu samanburðarefni (% lífvænleiki) og síðan notaður til að spá fyrir um möguleikann á að prófunaríðefni sé hættulegt fyrir augu.

7. Nothæfisstaðlar (17. heimild) eru tiltækir til að auðvelda fullgildingu á nýjum eða breyttum prófunum *í glasi* sem byggjast á RhCE, sem eru svipaðar og EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT, í samræmi við meginreglurnar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (18. heimild) og gefa færi á tímanlegum breytingum á OECD-viðmiðunarreglu 492 um prófanir til að bæta þeim við. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna (MAD), samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, fyrir prófanir sem eru fullgiltar samkvæmt nothæfisstöðlunum ef þessar prófanir hafa verið endurskoðaðar og felldar inn í samsvarandi viðmiðunarreglu OECD um prófanir.

SKILGREININGAR

8. Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

9. Þessi prófunaraðferð er byggð á þrívíðum RhCE-vefjalíkönum, sem fást á almennum markaði, sem eru framleidd með því að nota annað hvort fyrsta stigs hyrnisfrumur úr mönnum (þ.e. EpiOcular™ OCL-200) eða frumur glæruþekju úr mönnum sem hafa verið gerðar ódauðlegar (þ.e. SkinEthic™ HCE/S). RhCE-vefjalíkininn EpiOcular™ OCL-200 og SkinEthic™ HCE/S eru svipuð og þrívíð bygging glæruþekju *í lífi* og eru framleidd með því að nota frumur úr tegundum sem miðað er við (19.–20. heimild). Enn fremur eru frumueiturhrif, sem eru afleiðing af því þegar íðefni fer í gegnum glæruna og framköllun frumu- og vefjaskemmda, mæld beint með prófuninni; frumueitrandi svörun segir síðan til um alvarlegan augnskaða/augnertingu *í lífi* í heild sinni. Frumuskemmdir geta orðið vegna ýmissa verkunarhátta (sjá 20. lið) en frumueiturhrif eru mikilvægur, ef ekki helsti, verkunarmátinn sem ákvarðar samanlagða svörun við íðefni í formi alvarlegs augnskaða/augnertingar sem kemur aðallega fram *í lífi* sem ógagnsæi glæru, lithimnubólga, roði í slímhimnu og/eða tárubjúgur í slímhimnu, óháð eðlisefnafræðilegum ferlum sem liggja til grundvallar vefjaskemmdum.

10. Margs konar íðefni, sem ná yfir fjölbreyttar íðefnategundir, íðefnaflokka, sameindaþyngdir, LogP, efnafræðilega byggingu o.s.frv., voru prófuð í fullgildingarrannsókninni sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð. EpiOcular™ EIT-fullgildingargagnagrunnurinn innihélt 113 íðefni alls sem ná yfir 95 mismunandi lífræna virka hópa samkvæmt QSAR-verkfærakistugreiningu Efnahags- og framfarastofnunarinnar (e. *OECD QSAR toolbox analysis*) (8. heimild). Meirihluti þessara íðefna voru efni með einum efnisþætti en nokkur fjölþáttaefni (þ.m.t. 3 einsleitar fjölliður, 5 samfjölliður og 10 ígildi fjölliðna (e. *quasi polymer*) voru einnig tekin með í rannsókninni. Með tilliti til eðlisástands og undirflokka HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun var dreifing prófuðu íðefnanna 113 sem hér segir: 13 vökvar í 1. undirflokki, 15 föst efni í 1. undirflokki, 6 vökvar í undirflokki 2A, 10 föst efni í undirflokki 2A, 7 vökvar í undirflokki 2B, 7 föst efni í undirflokki 2B, 27 vökvar utan flokks og 28 föst efni utan flokks (8. heimild). SkinEthic™ HCE EIT-fullgildingargagnagrunnurinn innihélt 200 íðefni alls sem ná yfir 165 mismunandi lífræna virka hópa (8. og 10.–11. heimild). Meirihluti þessara íðefna voru efni með einum efnisþætti en nokkur fjölþáttaefni (þ.m.t. 10 fjölliður) voru einnig tekin með í rannsókninni. Með tilliti til eðlisástands og undirflokka HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun var dreifing prófuðu íðefnanna 200 sem hér segir: 27 vökvar í 1. undirflokki, 24 föst efni í 1. undirflokki, 19 vökvar í undirflokki 2A, 10 föst efni í undirflokki 2A, 9 vökvar í undirflokki 2B, 8 föst efni í undirflokki 2B, 50 vökvar utan flokks og 53 föst efni utan flokks (10.–11. heimild).

11. Þessi prófunaraðferð á við um efni og blöndur og um föst efni, vökva, hálfföst efni og vax. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera leysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fínt duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formeðhöndlun á sýninu er nauðsynleg. Ekki er búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsókn. Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með RhCE-tækninni er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð.

12. Prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun) og prófunaríðefni sem geta afoxað líflitinn MTT beint (í MTT-formasan) geta truflað mælingar á lífvænleika vefs og þörf er á aðlöguðum samanburði til leiðréttingar. Gerð aðlagaðs samanburðar sem kann að vera þörf á fer eftir því hvers konar truflun prófunaríðefnið veldur og eftir aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan (sjá 36.–42. lið).

13. Niðurstöður, sem urðu til í forfullgildingarrannsóknum (21.–22. heimild) og fullum fullgildingarrannsóknum (8. og 10.–11. heimild), sýndu að hægt er að yfirfæra bæði EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT yfir á rannsóknarstofur sem talið er að hafi ekki reynslu af því að framkvæma greiningarnar og að þau séu einnig samanburðarnákvæm innan og milli rannsóknarstofa. Byggt á þessum rannsóknum er samanburðarnákvæmnin, að því er varðar samsvörun spáa sem hægt er að búast við að fáist með EpiOcular™ EIT út frá gögnum um 113 íðefni, við 95% markið innan rannsóknarstofa og 93% milli rannsóknarstofa. Samanburðarnákvæmnin, að því er varðar samsvörun spáa sem hægt er að búast við að fáist með SkinEthic™ HCE EIT út frá gögnum um 120 íðefni, er við 92% markið innan rannsóknarstofa og 95% milli rannsóknarstofa.

14. Hægt er að nota EpiOcular™ EIT til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Út frá þeim gögnum sem fengust í fullgildingarrannsókninni (8. heimild) er heildarnákvæmni EpiOcular™ EIT 80% (byggt á 112 íðefnum), næmi 96% (byggt á 57 íðefnum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 4% (byggt á 57 íðefnum), sértæki 63% (byggt á 55 íðefnum) og hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 37% (byggt á 55 íðefnum) þegar þau eru borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð *í lífi* (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild) sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Í rannsókn þar sem 97 íðefnasamsetningar í landbúnaði voru prófaðar með EpiOcular™ EIT var sýnt fram á svipað nothæfi prófunaraðferðarinnar fyrir þessa tegund blandna og fékkst í fullgildingarrannsókninni (23. heimild). Dreifing samsetninganna 97 var sem hér segir: 21 í 1. undirflokki, 19 í undirflokki 2A, 14 í undirflokki 2B og 43 utan flokks, flokkaðar samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ á grundvelli tilvísunargagna úr augnprófunum *í lífi* á kanínum (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild). Eftirfarandi gildi fengust (23. heimild): heildarnákvæmni 82% (byggt á 97 samsetningum), næmi 91% (byggt á 54 samsetningum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 9% (byggt á 54 samsetningum), sértæki 72% (byggt á 43 samsetningum) og hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 28% (byggt á 43 samsetningum).

15. Hægt er að nota SkinEthic™ HCE EIT til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun. Út frá þeim gögnum sem fengust í fullgildingarrannsókninni (10.–11. heimild) er heildarnákvæmni SkinEthic™ HCE EIT 84% (byggt á 200 íðefnum), næmi 95% (byggt á 97 íðefnum), hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 5% (byggt á 97 íðefnum), sértæki 72% (byggt á 103 íðefnum) og hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 28% (byggt á 103 íðefnum) þegar þau eru borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð *í lífi* (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild) sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun.

16. Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna sem fengust með báðum RhCE-prófununum, annaðhvort með efnum eða blöndum, fellur innan 12% heildarlíkna á því að íðefni séu annað hvort greind sem efni í 2. undirflokki HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun eða utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun í endurteknum prófunum með Draize-augnprófuninni *í lífi*; þetta stafar af innbyggðum breytileika aðferðarinnar innan prófunarinnar (24. heimild). Hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna sem fengust með báðum RhCE-prófunaraðferðunum með efnum eða blöndum er ekki úrslitaatriði í tengslum við þessa prófunaraðferð vegna þess að öll prófunaríðefni, sem kalla fram lífvænleika vefja sem er jafn eða minni en fastsett þröskuldsgildi (sjá 44. lið), koma til með að útheimta frekari prófanir með öðrum prófunaraðferðum *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. Hægt er að nota þessar

prófunaraðferðir fyrir allar gerðir íðefna og þá skal samþykkja að með neikvæðri niðurstöðu flokkist íðefni ekki þannig að það sé augnertandi og valdi alvarlegum augnskaða (utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun). Hafa skal samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT eru notuð samkvæmt öðrum flokkunarkerfum en HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun.

17. Þessi prófunaraðferð er takmörkuð að því leyti að hún gerir ekki kleift að greina á milli augnertingar/afturhverfra áhrifa á augu (2. undirflokkur) og alvarlegs augnskaða/varanlegra áhrifa á augu (1. undirflokkur), eins og það er skilgreint í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun, né heldur á milli augnertandi efna (valkvæður undirflokkur 2A) og vægt augnertandi efna (valkvæður undirflokkur 2B), eins og það er skilgreint í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (1. heimild). Í þessu skyni er þörf á frekari prófunum með öðrum aðferðum til prófunar *í glasi*.

18. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa ([1]) og tengist ekki nothæfi RhCE-aðferðarinnar til prófunar á efnum og/eða blöndum.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

19. Prófunaríðefnið er borið staðbundið á a.m.k. tvö þrívíð RhCE-vefjalíkön og lífvænleiki vefja er mældur eftir váhrif og viðstöðutímabil eftir meðhöndlun. RhCE-vefir eru endurgerðir úr fyrsta stigs hyrnisfrumum úr mönnum eða úr frumum glæruþekju úr mönnum, sem hafa verið gerðar ódauðlegar, sem hafa verið ræktaðar í nokkra daga til að þær myndi lagskipta, mjög aðgreinda flöguþekju sem er formfræðilega lík þeirri sem er að finna í glæru í mönnum. EpiOcular™ RhCE-vefjalíkanið samanstendur af a.m.k. 3 lífvænlegum frumulögum og yfirborði án hornefnismyndunar með byggingu sem er lík glæru og er hliðstæð því sem finnst *í lífi*. SkinEthic™ HCE RhCE-vefjalíkanið samanstendur af a.m.k. 4 lífvænlegum frumulögum, þ.m.t. stuðlalaga grunnfrumur (e. *columnar basal cell*), millistigsvængfrumur (e. *transitional wing cell*) og grunnlægar flöguþekjufrumur (e. *superficial squamous cell*) sem líkjast þeim sem eru í eðlilegri glæruþekju í mönnum (20. og 26. heimild).

20. Alvarlegur augnskaði/augnerting sem íðefni kalla fram, sem kemur aðallega fram *í lífi* sem ógagnsæi glæru, lithimnubólga, roði í slímhimnu og/eða tárubjúgur í slímhimnu, er afleiðing keðjuverkandi atburða sem hefjast þegar íðefni fer í gegnum glæruna og/eða slímhimnuna og framköllun frumuskemmda. Frumuskemmdir geta orðið vegna ýmissa verkunarhátta, þ.m.t.: frumuhimnurof (t.d. vegna yfirborðsvirkra efna, lífrænna leysa); storknun stórsameinda (aðallega prótína) (t.d. vegna yfirborðsvirkra efna, lífrænna leysa, basa og sýra); sápumyndun lípíða (t.d. vegna basa) og alkýlun eða annars konar samgild víxlverkun við stórsameindir (t.d. vegna bleikiefna, peroxíða og alkýlandi efna) (15. og 27.–28. heimild). Þó hefur verið sýnt fram á að frumueiturhrif eru mikilvægur, ef ekki helsti, verkunarmátinn sem ákvarðar samanlagða svörun við íðefni í formi alvarlegs augnskaða/augnertingar, óháð eðlisefnafræðilegum ferlum sem liggja til grundvallar vefjaskemmdum (29.–30 heimild). Enn fremur ákvarðast máttur íðefnis til að valda alvarlegum augnskaða/augnertingu fyrst og fremst af umfangi upphafsskaðans (31. heimild) sem samsvarar umfangi frumudauða (29. heimild) og umfangi svörunar þar á eftir og endanlegri útkomu (32. heimild). Þess vegna hafa efni sem eru lítið ertandi yfirleitt einungis áhrif á yfirborð glæruþekjunnar, vægt ertandi og í meðallagi ertandi efni skaða aðallega þekjuna og yfirborð uppistöðuvefs og efni sem eru mjög ertandi skaða þekjuna, djúplægan uppistöðuvef og stundum innþekju glærunnar. Mæling á lífvænleika RhCE-vefjalíkans eftir staðbundin váhrif frá íðefni til að greina íðefni sem þurfa ekki flokkun m.t.t. alvarlegs augnskaða/augnertingar (utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) byggist á þeirri forsendu að öll íðefni, sem kalla fram alvarlegan augnskaða eða augnertingu, muni kalla fram frumueiturhrif í glæruþekjunni og/eða slímhimnunni.

([1]) Á sameiginlegum fundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar í júní 2013 var einhugur um að nú ætti að beita samræmdari notkun á hugtakinu „prófunaríðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum OECD-viðmiðunarreglum um prófanir til að lýsa því sem er prófað.

21. Lífvænleiki RhCE-vefja er yfirleitt mældur með umbreytingu með ensímum í lífvænlegum frumum vefsins á líflitnum MTT [3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár-tetrasólíumbrómíð, CAS-nr. 298-93-1] í blátt MTT-formasansalt sem er mælt megindlega eftir útdrátt úr vefjum (16. heimild). Íðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu samkvæmt HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (utan flokks) eru greind sem íðefni sem draga ekki úr lífvænleika vefs niður fyrir skilgreind viðmiðunarmörk (þ.e. lífvænleiki vefja > 60% í EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EITL ([1]) eða > 50% í SkinEthic™ HCE EITS ([2]) (sjá 44. lið).

SÝNT FRAM Á HÆFNI

22. Áður en RhCE-prófanir eru teknar til reglubundinnar notkunar í eftirlitsskyni skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni með því að spá rétt fyrir um hæfnisíðefnin 15 sem eru talin upp í töflu 1. Þessi íðefni voru valin úr íðefnum sem voru notuð í fullgildingarrannsóknum á fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (8. og 10.–11. heimild). Valið innihélt, að því marki sem unnt var, íðefni sem: i. ná yfir mismunandi eðlisástand; ii. ná yfir öll svið svörunar *í lífi* m.t.t. alvarlegs augnskaða/augnertingar byggt á hágæðaniðurstöðum, sem fengust í viðmiðunarprófun *í lífi* á kanínum (prófunaraðferð B.5) (2. og 14. heimild), og flokkunarkerfi HSK SÞ (þ.e. 1. undirflokkur, undirflokkur 2A eða undirflokkur 2B eða utan flokks) (1. heimild) og flokkunarkerfi reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (þ.e. 1. undirflokkur, 2. undirflokkur eða utan flokks); iii. ná yfir ýmsa þætti í *í lífi*-flokkun (25.–25. heimild); iv. eru dæmigerð fyrir íðefnaflokkana sem voru notaðir í fullgildingarrannsókninni (8. og 10.–11. heimild); v. ná yfir gott og breitt úrval af lífrænum virkum hópum (8. og 10.–11. heimild); vi. eru með vel skilgreinda efnafræðilega byggingu (8. og 10. –11. heimild); vii. eru litaðir og/eða beinir afoxarar MTT-litar; vii. gáfu samanburðarnákvæmar niðurstöður með RhCE-prófunaraðferðum meðan fullgilding þeirra stóð yfir; ix. spáð var rétt fyrir um þau með RhCE-prófunaraðferðunum meðan fullgildingarrannsóknir á þeim stóðu yfir; x. ná yfir öll svið svörunar í glasi, byggt á hágæðagögnum sem fengust með RhCE-prófunaraðferðunum (0–100% lífvænleiki); fást á almennum markaði; og xii. þeim fylgir ekki óásættanlegur kostnaður við kaup og/eða förgun. Ef skráð íðefni er ekki fáanlegt eða ef ekki er hægt að nota það af öðrum réttlætanlegum ástæðum er hægt að nota annað íðefni sem uppfyllir viðmiðanirnar sem lýst er hér að framan, t.d. eitt af íðefnunum sem voru notuð við fullgildinguna á fullgildu viðmiðunaraðferðinni (VRM). Þó skal færa rök fyrir slíkum frávikum.

Tafla 1

Skrá yfir hæfnisíðefni

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur ([1])	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) ([2])	VRM2 lífvænleiki (%) ([3])	VRM-spá	Afoxari MTT-litar	Litatruflun
1. undirflokkur *í lífi* ([4])								
Metýlþíóglýkólat	2 365-48-2	Karboxýlsýru-ester, þíóalkóhól	Fljótandi	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Ekki er hægt að setja fram spá	J (sterk)	N
Hýdroxýetýlakrýlat	818-61-1	Akrýlat, alkóhól	Fljótandi	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
2,5-dímetýl-2,5-hexandíól	110-03-2	Alkóhól	Fast	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
Natríumoxalat	62-76-0	Oxókar-boxýlsýra	Fast	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
Undirflokkur 2A *í lífi* ([4])								
2,4,11,13-tetraasatetra-dekan-díimídamíd, N,N″-bis(4-klórófenýl)-3,12-díimínó-, dí-D-glúkonat (20%, vatns-kennt) ([6])	18 472-51-0	Arómatískt heturhringað halíð, arýlhalíð, díhýdroxýl-hópur, gúanidín	Fljótandi	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Ekki er hægt að setja fram spá	N	J (væg)

([1]) EITL: EIT (augnertingarprófun) fyrir vökva ef um er að ræða SkinEthic™ HCE

([2]) EITS: EIT (augnertingarprófun) fyrir föst efni ef um er að ræða SkinEthic™ HCE

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur (1)	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) (2)	VRM2 lífvænleiki (%) (3)	VRM-spá	Afoxari MTT-litar	Litatruflun
Natríumbensóat	532-32-1	Arýl, karboxýlsýra	Fast	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
Undirflokkur 2B *í lífi* (4)								
Díetýltólúamíð	134-62-3	Bensamíð	Fljótandi	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
2,2-dímetýl-3-metýlenbísýkló [2.2.1] heptan	79-92-5	Greinótt alkan með þrígreindu kolefni, alkan, bísýklóheptan, brúaðir kolefnishringir (e. *bridged-ring carbocycles*), sýklóalkan	Fast	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Ekki er hægt að setja fram spá	N	N
Utan flokks *í lífi* (4)								
1-etýl-3-metýlimídasólíumetýlsúlfat	3425 73-75-5	Alkoxý, ammóníumsalt, arýl, imídasól, súlfat	Fljótandi	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Utan flokks	N	N
Díkaprýlýleter	629-82-3	Alkoxý, eter	Fljótandi	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Utan flokks	N	N
Píperónýlbútoxíð	51-03-6	Alkoxý, bensódíoxól, bensýl, eter	Fljótandi	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Utan flokks	N	N
Pólýetýlenglýkól (PEG-40) hert laxerolía	61 788-85-0	Akýlal, alkóhól, allýl, eter	Seigfljótandi	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Utan flokks	N	N
1-(4-klórfenýl)-3-(3,4-díklórófenýl)úrea	101-20-2	Arómatískt heturhringað halíð, arýlhalíð, þvagefnisafleiður	Fast	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Utan flokks	N	N
2,2′-metýlen-bis-(6-(2H-bensótríasól-2-ýl)-4-(1,1,3,3-tetrametýlbútýl)-fenól)	1035 97-45-1	Greinótt alkan með fjórgreindu kolefni, brædd kolefnishringuð arómatísk efnasambönd, brædd mettuð heturhringasambönd, forefni kínónefnasambanda, tertbútýl	Fast	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Utan flokks	N	N

Efnaheiti	CAS-númer	Lífrænn virkur hópur (1)	Eðlisástand	VRM1 lífvænleiki (%) (2)	VRM2 lífvænleiki (%) (3)	VRM-spá	Afoxari MTT-litar	Litatruflun
Kalíumtetraflúoróbórat	14 075-53-7	Ólífrænt salt	Fast	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Utan flokks	N	N

Skammstafanir:
CASRN = skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni; VRM1 = fullgilt viðmiðunaraðferð 1, EpiOcular™ EIT; VRM2 = fullgilt viðmiðunaraðferð 2, SkinEthic™ HCE EIT; litatruflun = litatruflun við mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) MTT-formasans.

(1) Lífrænn virkur hópur sem er úthlutað eftir stigskiptri greiningu samkvæmt verkfærakistu Efnahags- og framfarastofnunarinnar 3,1 (8. heimild).

(2) Byggt á niðurstöðum sem fengust með EpiOcular™ EIT í EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8. heimild).

(3) Byggt á niðurstöðum sem fengust með SkinEthic™ HCE EIT í fullgildingarrannsóknninni (10.–11. heimild).

(4) Byggt á niðurstöðum úr prófun *í lífi* á kanínuaugum (prófunaraðferð B.5/OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) (2. og 14. heimild) og með notkun á HSK SÞ.

(5) Byggt á niðurstöðum sem fengust í CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

(6) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SÞ til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. það þarf eitt dýr af þremur á móti tveimur dýrum af þremur að sýna svörun á sjöunda degi til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn *í lífi* voru notuð þrjú dýr. Allir endapunktar, fyrir utan ógagnsæi glæru hjá einu dýri, sýndu bata að stigi núll á sjöunda degi eða fyrr. Dýrið sem náði ekki fullum bata fyrir sjöunda dag hafði ógagnsæi glæru svo nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á níunda degi.

23. Mælt er með því að notendur sannprófi tálmaeiginleika vefjanna eftir viðtöku þeirra samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda RhCE-vefjalíkansins sem hluta af prófun á hæfni (sjá 25., 27. og 30. lið). Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar prófun hefur verið notuð á árangursríkan hátt og hæfni í notkun hennar hefur verið náð og sýnt fram á hana þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef prófun er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

VERKFERLI

24. Prófanirnar sem falla sem stendur undir þessa prófunaraðferð eru hinar vísindalega gildu EpiOcular™ EIT og SkinEthic™ HCE EIT (9. og 12.–13. heimild) sem vísað er til sem fullgiltrar viðmiðunaraðferðar (annars vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og hins vegar fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2)). Staðlaðar verklagsreglur fyrir RhCE-prófunaraðferðirnar eru fáanlegar og skulu notaðar þegar prófunaraðferðirnar eru innleiddar og notaðar á rannsóknarstofu (34.–35. heimild). Í eftirfarandi málsgreinum og í 2. viðbæti er lýsing á helstu þáttum og tilhögun RhCE-prófananna.

ÞÆTTIR Í RHCE-PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Almenn skilyrði

25. Nota skal viðeigandi frumur úr mönnum til að endurgera þrívíðan glærulíkan þekjuvef sem skal samsettur úr stigvaxandi lagskiptum frumum en ekki úr horngerðum frumum. RhCE-vefjalíkanið er undirbúið í innleggi með gropinni tilbúinni himnu sem næringarefni geta farið í gegnum til frumnanna. Mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum án hornefnismyndunar skulu vera til staðar í endurgerðri glærulíkri þekju. Þekjuyfirborð RhCE-vefjalíkansins skal vera í beinni snertingu við loft til að geta orðið fyrir beinum, staðbundnum váhrifum frá prófunaríðefnum á svipaðan hátt og glæruþekja yrði fyrir váhrifum *í lífi*. RhCE-vefjalíkanið skal mynda virkan tálma sem er nægilega traustur til að standast það að frumueitrandi viðmiðunarefni gangi hratt inn í það, t.d. Triton X-100 eða natríumdódekýlsúlfat. Sýna skal fram á tálmavirknina og hana má meta með því að ákvarða annaðhvort þann váhrifatíma sem þarf til að draga úr lífvænleika vefjarins um 50% (ET_{50}) þegar viðmiðunarefni er borið á í tilteknum, föstum styrk (t.d. 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100) eða styrk viðmiðunarefnis sem dregur úr lífvænleika vefjarins um 50% (IC_{50}) eftir fastan váhrifatíma (t.d. 30 mínútna meðhöndlun með 50 µl af natríumdódekýlsúlfati (sjá 30. lið). Afmörkunareiginleikar RhCE-vefjalíkansins skulu koma í veg fyrir að prófunaríðefni flytjist framhjá jaðri lífvænlega vefjarins sem gæti leitt til skerðingar á getu líkansins til að lýsa váhrifum á hornhimnu. Frumur úr mönnum, sem eru notaðar til að byggja upp RhCE-vefjalíkanið, skulu vera lausar við mengun af völdum baktería, veira, berfryminga og sveppa. Birgirinn skal athuga dauðhreinsað ástand vefjalíkansins m.t.t. þess að mengun af völdum sveppa og baktería sé ekki fyrir hendi.

Virkniaðstæður

Lífvænleiki

26. Greiningin sem er notuð til að magngreina lífvænleika vefja er greining með MTT-lit (16. heimild). Lífvænlegar frumur í RhCE-vefjalíkani afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani sem er svo dregin úr vefnum með ísóprópanóli

(eða svipuðum leysi). Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan annaðhvort með mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni (OD)) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun (e. *HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure*) (36. heimild). Ljósþéttni hreins útdráttarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. < 0,1. Notendur RhCE-vefjalíkans skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota RhCE-vefjalíkansins sem er notað uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Ásættanleg svið fyrir ljósþéttnigildi neikvæðs samanburðar fyrir fullgiltar viðmiðunaraðferðir eru tilgreind í töflu 2. Notandi litrófsmælingar með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun skal nota ljósþéttnisvið fyrir neikvæðan samanburð, sem er tilgreint í töflu 2, sem samþykktarviðmiðun fyrir neikvæða samanburðinn. Það skal skjalfest í prófunarskýrslunni að vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðu samanburðarefni, séu stöðugir í ræktun (veiti samsvarandi niðurstöður við mælingar á lífvænleika vefja) meðan váhrifatímabil prófunarinnar stendur yfir. Framleiðandi vefjarins skal fylgja svipuðu verklagi sem hluta af gæðaeftirliti með afhendingu vefjaframleiðslulotanna, en í þessu tilfelli geta aðrar samþykktarviðmiðanir átt við en þær sem eru tilgreindar í töflu 2. Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir ljósþéttnigildi neikvæða samanburðarins (gæðaeftirlitsskilyrði fyrir prófunaraðferðina).

Tafla 2

Ásættanleg svið fyrir ljósþéttnigildi neikvæðs samanburðar (fyrir notendur prófunar)

Prófun	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (bæði fyrir aðferðarlýsingu með vökva og með föstum efnum)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (bæði fyrir aðferðarlýsingu með vökva og með föstum efnum)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Í þessum ásættanleikamörkum er tekið tillit mögulegrar lengingar á flutninga-/geymslutíma (t.d. > 4 dagar) sem komið hefur í ljós að hefur ekki áhrif á nothæfi prófunaraðferðarinnar (37. heimild).

Tálmavirkni

27. RhCE-vefjalíkanið skal vera nægilega þykkt og traust til að standast það að frumueitrandi viðmiðunarefni gangi hratt inn í það, t.d. miðað við ET_{50} (Triton X-100) eða IC_{50} (natríumdódekýlsúlfat) (tafla 3). Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkans sem er notað skal sýna fram á tálmavirkni hverrar framleiðslulotu RhCE-vefjalíkansins þegar vefirnir eru afhentir endanlegum notanda (sjá 30. lið).

Formfræði

28. Vefjafræðileg rannsókn á RhCE-vefjalíkaninu skal sýna fram á byggingu þekju sem líkist glæru úr mönnum (þ.m.t. að minnsta kosti 3 lög af lífvænlegum þekjufrumum og yfirborð án hornefnismyndunar). Að því er varðar fullgiltar viðmiðunaraðferðir hefur hönnuður eða seljandi staðfest viðeigandi formfræði og því þarf notandi prófunaraðferðarinnar ekki að sýna fram á hana aftur fyrir hverja vefjalotu sem er notuð.

Samanburðarnákvæmni

29. Niðurstöður úr jákvæða og neikvæða samanburðinum skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni í langan tíma.

Gæðaeftirlit

30. RhCE-vefjalíkanið skal eingöngu notað ef hönnuður eða seljandi sýnir fram á að hver framleiðslulota RhCE-vefjalíkansins sem er notað uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar en af þeim skipta lífvænleiki (26. liður) og tálmavirkni (sjá 27. lið) mestu máli Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal staðfesta ásættanleg svið (efri og neðri mörk) fyrir tálmavirknina, eins og hún mælist með ET_{50} eða IC_{50} (sjá 25.–26. lið). Ásættanlegt svið ET_{50} og IC_{50}, sem hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins notar sem gæðaeftirlitsviðmiðun fyrir afhendingu framleiðslulota (notað í fullgiltum viðmiðunaraðferðum), er tilgreint í töflu 3. Hönnuður eða seljandi RhCE-vefjalíkansins skal láta notendum prófunaraðferðarinnar í té gögn sem sýna fram á að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir afhendingu framleiðslunnar svo þeir geti sett þessar upplýsingar í prófunarskýrsluna. Einungis er hægt að samþykkja niðurstöður, sem fást með vefjum sem uppfylla allar þessar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um íðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða í samræmi við HSK SÞ/reglugerðina um flokkun, merkingu og pökkun.

Tafla 3

Gæðaeftirlitsviðmiðun fyrir afhendingu framleiðslulota

Prófun	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 mín	ET_{50} = 37,5 mín
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 mínútna meðhöndlun með 50 µl af natríumdódekýlsúlfati)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Prófunaríðefni og samanburðarefni borin á

31. Nota skal a.m.k. tvö samhliða vefjasýni fyrir hvert prófunaríðefni og fyrir hvert samanburðarefni í hverri keyrslu. Notaðar eru tvær mismunandi aðferðarlýsingar meðhöndlunar, önnur fyrir fljótandi prófunaríðefni og hin fyrir föst prófunaríðefni (34.–35. heimild).Að því er varðar báðar aðferðir og aðferðalýsingar skal væta yfirborð vefjalíkansins með kalsíum- og magnesíumlausri fosfatstilltri saltlausn Dulbeccos (Ca^{2+}/Mg^{2+}-laus DPBS) áður en prófunaríðefnið er borið á til að líkja eftir rakaaðstæðum í mannsauganu. Meðhöndlun vefjanna hefst með váhrifum frá prófunaríðefni eða -íðefnum og samanburðarefnum. Að því er varðar báðar aðferðarlýsingar meðhöndlunar í báðum fullgiltu viðmiðunaraðferðunum skal bera nægilegt magn af prófunaríðefni eða samanburðarefni á til að þekja yfirborð þekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt.

32. Prófunaríðefni, sem hægt er að láta drjúpa úr pípettu við 37 °C eða lægri hita (með því að nota ruðningspípettu), eru meðhöndluð eins og vökvar í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum; að öðrum kosti skal meðhöndla þau sem föst efni (sjá 33. lið). Í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum er fljótandi prófunaríðefnum dreift jafnt yfir yfirborð vefjarins (þ.e. notkun að lágmarki 60 µl/cm^2) (sjá 2. viðbæti, (33.–34. heimild)). Forðast skal áhrif á háræðar (yfirborðsspennuáhrif), sem geta orðið vegna þess að magnið sem er sett í innskotsbollann (á yfirborð vefjarins) er svo lítið, að því marki sem mögulegt er til að tryggja rétta skömmtun á vefinn. Vefir, sem eru meðhöndlaðir með fljótandi prófunaríðefnum, eru látnir standa í 30 mín við stöðluð ræktunarskilyrði (37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig). Við lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja fljótandi prófunaríðefnið og samanburðarefnin varlega af yfirborði vefjarins með því að skola hann vandlega með Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn við stofuhita. Þessu skolunarþrepi er fylgt eftir með ídýfingu í nýtt æti við stofuhita eftir váhrifin (til að fjarlægja allt prófunaríðefni sem vefurinn hefur dregið í sig) í fyrirframskilgreindan tíma sem er breytilegur eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð (VRM) er notuð. Að því er varðar fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM 1) eingöngu er viðstaða í nýju æti eftir váhrif við stöðluð ræktunarskilyrði beitt áður en MTT-greiningin er framkvæmd (sjá 2. viðbæti, 34.–35. heimild)).

33. Prófunaríðefni, sem ekki er hægt að láta drjúpa úr pípettu við hitastig sem er allt að 37 °C, eru meðhöndluð eins og föst efni í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM). Magn prófunaríðefnis sem borið er á skal nægja til að þekja allt yfirborð vefjarins, þ.e. notkun að lágmarki 60 mg/cm^2 (2. viðbætir). Prófa skal föst efni í fíngerðu duftformi þegar því verður við komið. Vefir, sem eru meðhöndlaðir með föstum prófunaríðefnum, eru ræktaðir í fyrirframskilgreindan tíma (eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð (VRM) er notuð) við stöðluð ræktunarskilyrði (sjá 2. viðbæti, (34.–35. heimild)). Við lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja fasta prófunaríðefnið og samanburðarefnin varlega af yfirborði vefjarins með því að skola hann vandlega með Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn við stofuhita. Þessu skolunarþrepi er fylgt eftir með ídýfingu í nýtt æti við stofuhita eftir váhrifin (til að fjarlægja allt prófunaríðefni sem vefurinn hefur dregið í sig) í fyrirframskilgreindan tíma, sem er breytilegur eftir því hvaða fullgilta viðmiðunaraðferð er notuð, og síðan ræktun í nýju æti eftir váhrif við stofuhita við stöðluð ræktunarskilyrði áður en MTT-greiningin er framkvæmd (sjá 2. viðbæti, 34.–35. heimild)).

34. Samskeiða neikvæðir og jákvæðir samanburðir skulu teknir með í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (ákvarðaður með neikvæða samanburðinum) og næmi (ákvörðuð með jákvæða samanburðinum) vefjanna sé innan ásættanleikasviðs sem er skilgreint á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna. Samskeiða neikvæður samanburður gefur einnig grunnlínuna (100% lífvænleiki vefjar) til að reikna út hlutfallslegt hundraðshlutfall lífvænleika í vefjum sem eru meðhöndlaðir með prófunaríðefninu (% lífvænleiki$_{prófun}$). Jákvætt samanburðarefni, sem mælt er með að sé notað með fullgiltu viðmiðunaraðferðunum, er óblandað metýlasetat (CAS-nr. 79-20-9, fæst á almennum markaði, t.d. hjá Sigma-Aldrich, pöntunarnr. # 45 997; fljótandi). Neikvæð samanburðarefni, sem mælt er með að séu notuð með fullgiltri viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgiltri viðmiðunaraðferð 2 (VRM2), eru ofurhrein H_2O og Ca^{2+}/Mg^{2+}-laus fosfatstill saltlausn, eftir því sem við á. Þetta voru þau samanburðarefni sem voru notuð í fullgildingarrannsóknum á fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM) og þau sem flest rannsóknarsöguleg gögn eru til um. Notkun á hentugum staðgöngukosti fyrir jákvæð eða neikvæð samanburðarefni skal rökstudd með vísindalegum og fullnægjandi hætti. Neikvæðir og jákvæðir samanburðir skulu prófaðir eftir sömu aðferðarlýsingu(m) og er(u) notuð/notaðar fyrir prófunaríðefnin sem eru tekin með í keyrslunni (þ.e. fyrir fljótandi og/eða föst efni). Þessari framkvæmd skal fylgt eftir með meðhöndlunarváhrifum, skolun, íðýfingu eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif, eftir atvikum, eins og lýst er fyrir samanburðarprófanir sem eru keyrðar samskeiða fljótandi prófunaríðefnum (sjá 32. lið), eða fyrir samanburðarprófanir sem eru keyrðar samskeiða föstum prófunaríðefnum (sjá 33. lið), áður en MTT-greiningin er gerð (sjá 35. lið) (34.–35. heimild). Eitt sett af neikvæðum og jákvæðum samanburðum nægir fyrir öll prófunaríðefni í sama eðlisástandi (fljótandi eða föst) sem eru tekin með í sömu keyrslunni.

Mælingar á lífvænleika vefja

35. Greining með MTT er stöðluð megindleg aðferð (16. heimild) sem skal nota til að mæla lífvænleika vefs í þessari prófunaraðferð. Hún er samrýmanleg við notkun í þrívíðu vefjalíkani. MTT-greiningin er framkvæmd strax eftir viðstöðutímabilið eftir váhrif. Í fullgiltu viðmiðunaraðferðunum (VRM) er sýni af RhCE-vefjalíkani sett í 0,3 ml af 1 mg/ml MTT-lausn í 180 ± 15 mín við stöðluð ræktunarskilyrði. Lífvænlegar frumur í RhCE-vefjalíkaninu afoxa líflitinn MTT í útfellingu af bláu MTT-formasani. Útfellta bláa MTT-formasanið er síðan dregið út úr vefnum með því að nota viðeigandi magn af ísóprópanóli (eða svipuðum leysi) (34.–35. heimild). Útdrættir úr vefjum, sem eru prófaðir með fljótandi prófunaríðefnum, skulu teknir bæði ofan og neðan af vefjunum en útdrættir úr vefjum, sem eru prófaðir með föstum prófunaríðefnum, skulu einungis teknir neðan af vefnum (til að lágmarka alla hugsanlega mengun ísóprópanól-útdráttarlausnarinnar af völdum prófunaríðefnis sem hefur e.t.v. orðið eftir á vefnum). Einnig má taka útdrætti úr vefjum, sem eru prófaðir með fljótandi prófunaríðefnum sem skolast ekki auðveldlega af, neðan af vefnum eingöngu. Neikvæð og jákvæð samanburðarefni, sem eru prófuð samskeiða, skulu meðhöndluð á svipaðan hátt og prófaða íðefnið. Hægt er að magngreina útdregið MTT-formasan annaðhvort með mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki ± 30 nm eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun (sjá 42. lið) (11. og 36. heimild).

36. Ljósfræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins eða efnafræðileg verkun þess á MTT geta truflað mælingu á MTT-formasani og leitt til rangs mats á lífvænleika vefjarins. Prófunaríðefni geta truflað mælingu á MTT-formasani með beinni afoxun MTT í blátt MTT-formasan og/eða með litatruflun ef prófunaríðefnið gleypir í sig, annað hvort frá náttúrunnar hendi eða vegna meðhöndlunar, á sama ljósþéttnisviði og MTT-formasanið (þ.e. í kringum 570 nm). Gera skal forathuganir fyrir prófun til að unnt sé að greina mögulega beina MTT-afoxara og/eða litatruflandi íðefni og nota skal viðbótarsamanburði til að greina og leiðrétta fyrir hugsanlegri truflun frá slíkum prófunaríðefnum (sjá 37.–41. lið). Þetta skiptir einkum máli þegar tiltekið prófunaríðefni er ekki skolað algerlega af RhCE-vefjalíkaninu eða þegar það gengur inn í glærulíku þekjuna og er því fyrir hendi í RhCE-vefjalíkaninu þegar MTT-greiningin er gerð. Að því er varðar prófunaríðefni sem gleypa ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun), sem samrýmast ekki mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) MTT-formasans vegna of mikillar truflunar, þ.e. mikil gleypni við 570 ± 30 nm, má nota litrófs-mælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun til að mæla MTT-formasanið (sjá 41.–42. lið) (11. og 36. heimild). Í stöðluðum verklagsreglum fyrir fullgiltu viðmiðunaraðferðirnar (34.–35. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig á að greina og leiðrétta fyrir beinni afoxun MTT og truflun frá litunarefnum (34.–35. heimild). Flæðirit til skýringar, sem veita leiðbeiningar um hvernig á að greina og meðhöndla beina afoxara MTT-litar og/eða litatruflandi íðefni fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilta viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2), er einnig að finna í III. viðbæti annars vegar og í IV. viðbæti hins vegar.

37. Til að greina hugsanlega truflun frá prófunaríðefnum sem gleypa í sig ljós á sama sviði og MTT-formasan (á náttúrulegan hátt eða eftir meðhöndlun) og ákvarða þörf fyrir viðbótarsamanburði er prófunaríðefninu bætt í vatn og/eða ísóprópanól og látið standa hæfilega lengi við stofuhita (sjá 2. viðbæti, (34.–35. heimild)). Ef prófunaríðefni í vatni og/eða ísóprópanóli gleypir í sig nægilegt ljós á sviðinu 570 ± 20 nm fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) (sjá 3. viðbæti), eða ef lituð lausn fæst þegar prófunaríðefnið er blandað með vatni fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) (sjá 4. viðbæti), er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið trufli mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) MTT-formasans og framkvæma skal frekari samanburði á litgjöfum eða, að öðrum kosti, nota litrófsmælingu með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun, en í því tilviki er ekki þörf á þessum samanburði (sjá 41.–42. lið og III. og IV. viðbæti) (34.–35. heimild). Þegar mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) er gerð skal hvert truflandi prófunaríðefni borið á a.m.k. tvö lífvænleg samhliða vefjasýni sem gangast undir alla prófunaraðferðina en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepinu stendur til að fá samanburð fyrir ósértæka litun í lifandi vef ($NSC_{lifandi}$) (34.–35. heimild). Samanburður $NSC_{lifandi}$ skal gerður samskeiða prófuninni á litaða prófunaríðefninu og ef um er að ræða margar prófanir skal gera óháðan samanburð $NSC_{lifandi}$ fyrir hverja framkvæmda prófun (í hverri keyrslu) vegna eðlislægs líffræðilegs breytileika lifandi vefjar. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá truflandi prófunaríðefni og ræktaður í MTT-lausn ($\%lífvænleiki_{prófun}$) að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá truflandi prófunaríðefni og ræktaður í æti án MTT, sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{lifandi}$), þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar = [$\%lífvænleiki_{prófun}$] - [$\%NSC_{lifandi}$].

38. Til að greina beina afoxara MTT-litar beint skal bæta hverju prófunaríðefni út í nýtilreidda MTT-lausn. Viðeigandi magni prófunaríðefnis er bætt við MTT-lausn og blandan er látin standa í u.þ.b. 3 klst. við stöðluð ræktunarskilyrði (sjá III. og IV. viðbæti) (34.–35. heimild). Ef MTT-blandan sem inniheldur prófunaríðefnið (eða sviflausn fyrir óleysanleg prófunaríðefni) verður blá/fjólublá er gert ráð fyrir að prófunaríðefnið afoxi MTT beint og framkvæma skal frekari athuganir á virkni ólífvænlegra RhCE-vefjalíkana, óháð því hvort notuð er mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) eða litrófsmælingaraðferð með háþrýsti/-úthápýstivökvaskiljun. Í þessari viðbótarathugun á virkni er notaður dauður vefur sem hefur einungis eftirstandandi efnaskiptavirkni en gleypir í sig og heldur prófunaríðefninu á svipaðan hátt og lífvænlegur vefur. Dauðir vefir fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) eru útbúnir með því að láta þá verða fyrir váhrifum við lágt hitastig (drepnir með frystingu). Dauðir vefir fyrir fullgilta viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) eru útbúnir með framlengdum viðstöðutíma (t.d. í a.m.k. 24 ± 1 klst.) í vatni og síðan geymdir við lágt hitastig (drekktir í vatni). Hvert prófunaríðefni sem afoxar MTT-litinn er sett á a.m.k. tvö samhliða sýni úr dauðum vef sem gangast undir alla prófunaraðferðina til að fá samanburð fyrir ósértæka afoxun MTT (NSMTT) (34.–35. heimild). Stakur NSMTT-samanburður nægir fyrir hvert prófunaríðefni, án tillits til óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem var látinn verða fyrir váhrifum frá afoxara MTT-litar ($\%lífvænleiki_{prófun}$), að frádregnu hundraðshlutfalli ósértækrar MTT-afoxunar sem er fengið með dauðum vef sem var látinn verða fyrir váhrifum af sama afoxara MTT-litar, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt (%NSMTT), þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar = [$\%lífvænleiki_{prófun}$] - [%NSMTT].

39. Að því er varðar prófunaríðefni sem sanngreint er að valdi bæði litatruflun (sjá 37. lið) og beinni afoxun MTT (sjá 38. lið) er einnig þörf á þriðju gerðinni af samanburði, auk NSMTT-samanburðar og $NSC_{lifandi}$-samanburðar sem er lýst í undangengnum liðum, við mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni). Þetta á yfirleitt við um dökklituð prófunaríðefni sem gleypa í sig ljós á sviðinu 570 ± 30 nm (t.d. blár, fjólublár, svartur) þar eð eðlislægur litur þeirra hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 38. lið. Þetta þvingar sjálfkrafa fram notkun á NSMTT-samanburðum ásamt $NSC_{lifandi}$,-samanburðum. Bæði lifandi og dauðir vefir geta ísogað og geymt prófunaríðefni sem bæði NSMTT- og $NSC_{lifandi}$-samanburðir eru gerðir fyrir. Í þessu tilviki leiðréttir NSMTT-samanburðurinn því e.t.v. ekki eingöngu fyrir hugsanlegri beinni afoxun MTT af völdum prófunaríðefnisins heldur einnig fyrir litatruflun sem kemur til vegna ísogs og geymdar dauðra vefja á prófunaríðefninu. Þetta gæti leitt til tvöfaldrar leiðréttingar á litatruflun þar eð samanburður $NSC_{lifandi}$ leiðréttir þegar fyrir litatruflun sem kemur til vegna ísogs og geymdar lifandi vefja á prófunaríðefninu. Til að koma í veg fyrir mögulega tvöfalda leiðréttingu fyrir litatruflun þarf að gera þriðja samanburðinn fyrir ósértæka litun með dauðum vef ($NSC_{dauður}$) sjá III. og IV. viðbæti (34.–35. heimild). Í þessum viðbótarsamanburði er prófunaríðefnið sett á

minnst tvö samhliða sýni úr dauðum vef sem gangast undir allt prófunarferlið en eru ræktuð í æti í stað MTT-lausnar á meðan á MTT-ræktunarþrepinu stendur. Stakur samanburður $NSC_{dauður}$ nægir fyrir hvert prófunaríðefni, óháð fjölda óháðra prófana/keyrslna sem gerðar eru, en skal gerður samskeiða NSMTT-samanburði og með sömu vefjalotu. Raunverulegur lífvænleiki vefjar er reiknaður út sem: hundraðshlutfall lífvænleika vefjar, fengið með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu ($\%lífvænleiki_{prófun}$), að frádregnu %NSMTT, að frádregnu $\%NSC_{lifandi}$, að viðbættu hundraðshlutfalli ósértækrar litunar sem er fengið með dauðum vef sem er látinn verða fyrir váhrifum af truflandi prófunaríðefni og ræktaður í æti án MTT, reiknað út í samanburði við neikvæða samanburðinn sem er keyrður samskeiða prófuninni sem er leiðrétt ($\%NSC_{dauður}$) (þ.e. raunverulegur lífvænleiki vefjar = [$\%lífvænleiki_{prófun}$] - [%NSMTT] - [$\%NSC_{lifandi}$] + [$\%NSC_{dauður}$].

40. Mikilvægt er að taka mið af því að ósértæk afoxun MTT og ósértæk litatruflun getur aukið ljósþéttni (þegar gerðar eru mælingar á staðalgleypni) vefjaútdráttarins þannig að hún lendi utan línuleikasviðs litrófsmælisins og að ósértæk afoxun MTT getur einnig aukið toppflatarmál MTT-formasansins (þegar gerðar eru litrófsmælingar með háþrýsti-/útháþrýstivökvaskiljun) i vefjaútdrættinum þannig að það lendi utan línuleikasviðs litrófsmælisins. Á þeim grundvelli er mikilvægt að hver rannsóknarstofa ákvarði ljósþéttni/línuleikasvið toppflatarmáls fyrir sinn litrófsmæli með t.d. MTT-formasani (CAS-númer 57 360-69-7), sem fæst á almennum markaði hjá t.d. Sigma-Aldrich (pöntunarnr. # M2003) áður en prófun á prófunaríðefnum í eftirlitsskyni hefst.

41. Mæling á staðalgleypni (ljósþéttni) með notkun litrófsmælis er viðeigandi til að meta beina afoxara MTT-litar og prófunaríðefni sem trufla litun þegar truflunin sem kemur í ljós við mælingu á MTT-formasani er ekki of mikil (þ.e. ljósþéttni vefjaútdráttanna, sem fæst með prófunaríðefni án nokkrar leiðréttingar fyrir beinni MTT-afoxun og/eða litatruflun, mælist innan línuleikasviðs litrófsmælisins). Engu að síður skulu niðurstöður fyrir prófunaríðefni sem valda %NSMTT og/eða $\%NSC_{lifandi} \geq 60\%$ ((fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) fyrir aðferðarlýsingu með vökva) eða 50% (fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) fyrir aðferðarlýsingu með föstum efnum) af neikvæða samanburðinum teknar með fyrirvara þar eð þetta er ákvarðað þröskuldsgildi sem er notað í fullgildu viðmiðunaraðferðunum til að skilja á milli flokkaðra og óflokkaðra íðefna (sjá 44. lið). Þó er ekki hægt að mæla staðalgleypni (ljósþéttni) þegar truflun við mælingar á MTT-formasani er of mikil (þ.e. leiðir til óleiðréttrar ljósþéttni prófunarvefjaútdráttana sem fellur utan við línuleikasviðs litrófsmælisins). Lituð prófunaríðefni eða prófunaríðefni sem verða lituð þegar þau komast í snertingu við vatn eða ísóprópanól, sem trufla mælingu á staðalgleypni (ljósþéttni) MTT-formasans of mikið, er þó enn hægt að meta með því að nota litrófsmælingar með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun (sjá III. og IV. viðbæti). Þetta stafar af því að litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun gerir kleift að skilja MTT-formasanið frá íðefninu fyrir magnákvörðun (36. heimild). Af þessum sökum er ekki þörf á $NSC_{lifandi}$ eða $NSC_{dauðum}$ samanburði þegar litrófsmæling með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun er notuð, óháð íðefninu sem er prófað. Samt sem áður skal nota NSMTT-samanburð ef grunur er um að prófunaríðefnið afoxi MTT beint (samkvæmt aðferðinni sem lýst er í 38. lið). Einnig skal nota NSMTT-samanburði með prófunaríðefnum í lit (eigin litur eða sem kemur fram í vatni) sem hindrar mat á getu þeirra til beinnar afoxunar MTT, eins og lýst er í 38. lið. Þegar litrófsmæling með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun er notuð til að mæla MTT-formasan er hundraðshlutfall lífvænleika vefjar reiknað út sem hundraðshlutfall toppflatarmáls MTT-formasans, sem fæst með lifandi vef sem er látinn verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, í samanburði við toppgildi MTT-formasans sem er fengið með samskeiða neikvæðum samanburði. Að því er varðar prófunaríðefni sem geta afoxað MTT beint er raunverulegur lífvænleiki vefjar reiknaður út sem: $\%lífvænleiki_{prófun}$ að frádregnu %NSMTT eins og lýst er í síðasta málsliðnum í 38. lið. Að lokum skal tekið fram að ekki er unnt að meta með RhCE-prófunaraðferðum beina afoxara MTT-litar, eða beina afoxara MTT-litar sem geta einnig truflað litun, sem verða eftir í vefjum eftir meðhöndlun og afoxa MTT að svo miklu leyti að þeir leiða til ljósþéttni (með notkun staðlaðrar ljósþéttnimælingar) eða toppflatarmáls (með litrófsmælingu með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun) prófaðs vefjaútdráttar sem lendir utan línuleikasviðs litrófsmælisins, þó að ekki sé búist við að slíkt gerist nema í undantekningartilvikum.

42. Nota má litrófsmælingu með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun með öllum gerðum prófunaríðefna (lituð, ólituð, afoxarar MTT-litar og efni sem eru það ekki) til að mæla MTT-formasan (11. og 36. heimild). Vegna fjölbreytni litrófsmælingakerfa með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun er ekki mögulegt að hver notandi geti skapað nákvæmlega sömu kerfisskilyrðin. Sýna skal fram á hæfi litrófsmælingakerfis með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun sem slíks áður en það er notað til að magngreina MTT-formasan úr vefjaútdrætti með því að sýna að samþykktarviðmiðanirnar séu uppfylltar fyrir staðlaða mæliþætti fyrir hæfi, á grundvelli þeirra sem lýst er í leiðbeiningum Matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna fyrir iðnaðinn um fullgildingu lífgreiningaraðferða (36. og 38. heimild). Þessir helstu mæliþættir og samþykktarviðmiðanirnar þeirra eru sýnd í 5. viðbæti. Um leið og samþykktarviðmiðanirnar, sem eru skilgreindar í 5. viðbæti, eru uppfylltar telst litrófsmælingakerfið með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun hæft til mælingar á MTT-formasani samkvæmt rannsóknarskilyrðunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

Samþykktarviðmiðanir

43. Í hverri keyrslu þar sem notaðar eru RhCE-vefjaframleiðslulotur sem standast gæðaeftirlit (sjá 30. lið) skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðu samanburðarefni, sýna ljósþéttni sem endurspeglar gæði vefjanna sem hafa farið gegnum öll skref sendingar- og viðtökuferlisins og alla meðhöndlun samkvæmt aðferðarlýsingu og skulu ekki falla utan rannsóknarsögulegra fastsettra marka sem lýst er í töflu 2 (sjá 26. lið), Á sama hátt skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með jákvæðu samanburðarefni, þ.e. metýlasetati, sýna meðaltal vefjalífvænleika < 50% í samanburði við neikvæða samanburðinn í fullgiltri viðmiðunaraðferð 1 (VRM1), annaðhvort með aðferðarlýsingu með vökva eða með föstum efnum, og ≤ 30% (aðferðarlýsing með vökva) eða ≤ 20% (aðferðarlýsing með föstum efnum) í samanburði við neikvæða samanburðinn í fullgiltri viðmiðunaraðferð 2 (VRM2) og endurspegla þannig getu vefjanna til að sýna svörun við ertandi prófunaríðefni við skilyrði prófunaraðferðarinnar (34.–35. heimild). Breytileiki milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefnum og samanburðarefnum skal falla innan ásættanlegra marka (þ.e. mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera undir 20% eða þá að staðalfrávikið milli þriggja samhliða vefjasýna skal ekki fara yfir 18%). Ef annað hvort neikvæði eða jákvæði samanburðurinn í keyrslu lendir utan ásættanlegs sviðs telst keyrslan ekki fullgild og skal hún endurtekin. Ef breytileiki milli samhliða vefjasýna með prófunaríðefni lendir utan ásættanlegs sviðs verður að líta svo á að prófunin sé ekki fullgild og prófunaríðefnið skal prófað aftur.

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

44. Nota skal ljósþéttnigildi/toppflatarmál, sem fást með samhliða vefjaútdráttum, fyrir hvert prófunaríðefni til að reikna út meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika (meðaltal milli samhliða vefjasýna), staðlað að neikvæða samanburðinum sem er fastsettur við 100%. Þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika frumna til að greina prófunaríðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun) er tilgreint í töflu. Niðurstöðurnar skulu túlkaðar sem hér segir:

— Prófunaríðefnið er greint sem efni sem þarf ekki flokkun og merkingu samkvæmt HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (utan flokks) ef meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif er hærra en (>) fastsetta þröskuldsgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika vefja eins og sýnt er í töflu 4. Í þessu tilviki er ekki þörf á frekari prófunum með öðrum prófunaraðferðum.

— Ef meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika eftir váhrif og viðstöðu eftir váhrif er lægra en eða jafnt og (≤) fastsetta þröskuldsgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika vefja er ekki hægt að setja fram spá eins og sýnt er í töflu 4. Í þessu tilviki er þörf á frekari prófunum með öðrum prófunaraðferðum vegna þess að RhCE-prófunaraðferðir sýna tiltekinn fjölda falsjákvæðra niðurstaðna (sjá 14.–15. lið) og geta ekki skilið á milli 1. undirflokks og 2. undirflokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun (sjá 17. lið).

Tafla 4

Spálíkön samkvæmt flokkun HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun

Fullgilt viðmiðunaraðferð (VRM)	Utan flokks	Ekki er hægt að setja fram spá
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (fyrir báðar aðferðarlýsingar)	Meðaltal vefjalífvænleika > 60%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 60%
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (fyrir aðferðarlýsingu með vökva)	Meðaltal vefjalífvænleika > 60%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 60%
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (fyrir aðferðarlýsingu með föstum efnum)	Meðaltal vefjalífvænleika > 50%	Meðaltal vefjalífvænleika ≤ 50%

45. Stök prófun sem er samsett úr a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum ætti að nægja fyrir prófunaríðefni ef niðurstaðan er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörun er í samhliða mælingum og/eða meðalhundraðshlutfall vefjalífvænleika er 60 ± 5% (fullgilt viðmiðunaraðferð 1 (VRM1) og fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) með vökva) eða 50 ± 5% (fullgilt viðmiðunaraðferð 2 (VRM 2) með föstum efnum) skal tekið til athugunar að gera aðra prófun, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu prófununum tveimur.

46. Taka má til athugunar mismunandi þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika vefja, sem greina flokkuð prófunaríðefni frá óflokkuðum prófunaríðefnum, fyrir tilteknar tegundir blandna, eftir því sem við á og er réttlætanlegt, til þess að auka heildarárangur prófunaraðferðarinnar fyrir þessar tegundir blandna (sjá 14. lið). Viðmiðunaríðefni geta komið að gagni við að meta mátt óþekktra íðefna til að valda alvarlegum augnskaða/augnertingu eða vöruflokk þeirra eða til að meta hlutfallslega möguleika á eiturhrifum flokkaðs prófunaríðefnis á augu innan tiltekins sviðs jákvæðrar svörunar.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

47. Setja skal gögn um einstök samhliða vefjasýni í keyrslu (t.d. ljósþéttnigildi/toppflatarmál MTT-formasans og útreiknuð gögn um hundraðshlutfall vefjalífvænleika fyrir prófunaríðefnið og samanburðina og spá um endanlega RhCE-prófunaraðferð) fram í töfluformi fyrir hvert prófunaríðefni, þ.m.t. gögn úr endurteknum prófunum eins og við á. Þar að auki skal gera grein fyrir meðalhundraðshlutfalli vefjalífvænleika og mismuninum á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna (ef n = 2 samhliða vefjasýni) eða staðalfráviki (ef n ≥ 3 samhliða vefjasýni) fyrir hvert stakt prófunaríðefni og samanburð. Ef truflun frá prófunaríðefni kemur í ljós við mælingu á MTT-formasani gegnum beina MTT-afoxun og/eða litatruflun skal greina frá því fyrir hvert prófunaríðefni.

Prófunarskýrsla

48. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Eðlisástand, rokgirni, sýrustig, LogP, sameindaþyngd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, 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).

— 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.

— Eðlisástand og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, 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).

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

Jákvæð og neikvæð samanburðarefni

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-skráningarnúmer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Eðlisástand, rokgirni, sameindaþyngd, íðefnaflokkur og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, 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).

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir því að nota annan neikvæðan samanburð en ofurhreint H_2O eða Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausa fosfatstillta saltlausn, ef við á.

— Rökstuðningur fyrir því að nota annan jákvæðan samanburð en óblandað metýlasetat, ef við á.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur.

Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

— Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

— *RhCE-vefjalíkan og aðferðarlýsing sem eru notuð (með rökstuðningi fyrir valinu, ef við á)*

Skilyrði fyrir prófunaraðferðina

— RhCE-vefjalíkan sem er notað, þ.m.t. númer framleiðslulotu.

— Bylgjulengd og bandsía (ef við á) sem eru notuð til að magngreina MTT-formasan og línuleikasvið mælibúnaðar (t.d. litrófsmælir).

— Lýsing á aðferðinni sem er notuð til að magngreina MTT-formasan.

— Lýsing á litrófsmælingakerfi með háþrýsti-/úthápýstivökvaskiljun sem er notað, ef við á.

— Heildarupplýsingar til stuðnings notkun á tilteknu RhCE-vefjalíkani, þ.m.t. nothæfi þess. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:

  i. Gæðaeftirlit með lífvænleika (birgir).

  ii. Lífvænleiki við prófunaraðferðarskilyrðin (notandi).

  iii. Gæðaeftirlit með tálmavirkni.

  iv. Formfræði, ef hún liggur fyrir.

  v. Samanburðarnákvæmni og forspárgeta.

  vi. Annað gæðaeftirlit með RhCE-vefjalíkaninu, ef það liggur fyrir.

— Tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um RhCE-vefjalíkanið. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það: Ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvísun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur.

— Yfirlýsing þess efnis að prófunarstöðin hafi sýnt fram á hæfni við notkun prófunaraðferðarinnar fyrir reglubundna notkun með því að prófa hæfnisíðefnin.

Samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir

— Meðaltal fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð og ásættanleikasvið á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna.

— Ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð.

— Ásættanlegur breytileiki milli samhliða vefjasýna fyrir prófunaríðefnið.

Prófunaraðferð

— Upplýsingar um prófunarferlið sem er notað.

— Skammtar prófunaríðefnis og samanburðarefnis sem eru notaðir.

— Tímalengd og hitastig við váhrif, ídýfing eftir váhrif og stöðutímabil eftir váhrif (eftir atvikum).

— Lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

— Tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir beina afoxara MTT-litar og/eða litandi prófunaríðefni, ef við á.

— Fjöldi samhliða vefjasýna sem eru notuð fyrir hvert prófunaríðefni og samanburðir (jákvæður samanburður, neikvæður samanburður, NSMTT, $NSC_{lifandi}$ og $NSC_{dauður}$, ef við á).

Niðurstöður

— Töflusetning gagna um stök prófunaríðefni og samanburðarefni fyrir hverja keyrslu (þ.m.t. endurteknar tilraunir, ef við á) og hverja samhliða mælingu, þ.m.t. ljósþéttnigildi eða toppflatarmál MTT-formasans, hundraðshlutfall lífvænleika vefja, meðalhundraðshlutfall lífvænleika vefja, mismunur milli samhliða vefjasýna eða staðalfrávik og endanleg spá.

— Ef við á, niðurstöður úr samanburðum sem eru notaðir fyrir beina afoxara MTT-litar og/eða lituð prófunaríðefni, þ.m.t. ljósþéttnigildi eða toppflatarmál MTT-formasans, %NSMTT, $\%NSC_{lifandi}$, $\%NSC_{dauður}$, mismunur milli samhliða vefjasýna eða staðalfrávik, endanlegt rétt hundraðshlutfall lífvænleika vefja og endanleg spá.

— Niðurstöður sem fengust með prófunaríðefninu eða prófunaríðefnunum og samanburðarefnunum í tengslum við skilgreindar samþykktarviðmiðanir fyrir keyrslur og prófanir.

— Lýsingar á öðrum áhrifum sem fram komu, t.d. litun vefja vegna litaðs prófunaríðefnis.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstaða

HEIMILDIR

1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

2) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting

3) 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.

4) 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.

5) Kafli B.61 í þessum viðauka, prófunaraðferð með flúrskinslausnarleka til greiningar á efnum sem eru ætandi og mjög ertandi fyrir augu.

6) Kafli B.68 í þessum viðauka, prófunaraðferð í glasi með skammvinnum váhrifum til að greina i. íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.

7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.

8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Aðgengilegt á: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280

9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/0436 97. Aðgengilegt á: http://publications.jrc.ec.europa.eu/ repository/handle/JRC103702

10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

12) URL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/3903 90. Aðgengilegt á: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704

13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

15) 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., 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.

16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Í: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, bls. 147-159.

21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.

23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, bls. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, bls. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

30) Maurer, J.K., Parker, R.D., 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.

31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610–2 625.

33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Aðgengilegt á: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Aðgengilegt á: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Aðgengilegt á: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf

39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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 (18. heimild).

Viðmiðunaríðefni: Íðefni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunaríðefni. Viðmiðunaríðefni skal hafa eftirfarandi eiginleika: i) einsleitan og áreiðanlegan uppruna m.t.t. greiningar á því og lýsingar á eiginleikum, ii) líkindi í byggingu, virkni og/eða íðefna- eða völuflokk sem er svipaður og íðefni(n) sem er verið að prófa, iii) þekkta eðlisefnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Neðansækin nálgun: Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir prófunaríðefni sem talið er að þurfi ekki flokkun og merkingu m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem þurfa ekki flokkun og merkingu (neikvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (jákvæð niðurstaða).

Íðefni: Efni eða blanda.

Samsvörun: Sjá „Nákvæmni“.

Glæra: Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

CV (e. *Coefficient of variation*): Frávikstuðull.

Dev: (e. *Deviation*) Frávik.

EIT: (e. *Eye Irritation Test*): Augnertingarprófun.

EURL ECVAM: Tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum.

Augnerting: Breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „2. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðin um flokkun, merkingu og pökkun“.

ET_{50}: Sá váhrifatími sem þarf til að draga úr lífvænleika vefjar um 50% við notkun viðmiðunaríðefnis við tilgreindan, fastan styrk.

Falsneikvæðar niðurstöður: Hlutfall allra jákvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Falsjákvæðar niðurstöður: Hlutfall allra neikvæðra efna 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 kemst í snertingu við það efni.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

HPLC: Háþrýstivökvaskiljun.

IC_{50}: Sá styrkur viðmiðunaríðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjar um 50% eftir fastan váhrifatíma (t.d. 30 mínútna meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati).

Ótakmarkaður skammtur: Það magn prófunaríðefnis sem er borið á RhCE-vefjalíkanið og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð þekjunnar fullkomlega og jafnt.

Varanleg áhrif á augu: Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

LLOQ: Neðri magngreiningarmörk.

LogP: Logri fyrir deilistuðul oktanóls/vatns.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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.

MTT: 3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð.

Neikvæður samanburður: Sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar ekki jákvæða svörun í prófunarkerfinu. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni, og öðrum samanburðarsýnum og er notað til að ákvarða 100% lífvænleika vefjar.

Ekki flokkað: Íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar (2. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun eða undirflokkar 2A eða 2B) eða alvarlegs augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun). Jafngildir „utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun“.

$NSC_{dauður}$: Samanburður fyrir ósértæka litun með dauðum vef.

$NSC_{lifandi}$: Samanburður fyrir ósértæka litun með lifandi vef.

NSMTT: Ósértæk afoxun MTT.

OD: Ljósþéttni.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð sem var talin vísindalega gild, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Þeir fela í sér: i) grundvallarþætti prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru sambærilegir þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (18. heimild).

Jákvæður samanburður: Sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun í prófunarkerfinu. Sýnið er unnið með sýnum sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni og öðrum samanburðarsýnum. 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 (18. 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 samanburðar-nákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (18. heimild).

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 (18. heimild).

Samanburðarnákvæmni: Samkvæmni í niðurstöðum sem fást með endurteknum prófunum á sama prófunaríðefninu með því að nota sömu aðferðarlýsingu prófunar (sjá áreiðanleika) (18. heimild).

Afturhverf áhrif á augu: Sjá „Augnerting“.

RhCE: Endurgerð þekja sem líkist glæru úr mönnum.

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með neikvæðum samanburði og með jákvæðum samanburði.

SD: Staðalfrávik.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra prófunarefna 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 (18. heimild).

Alvarlegur augnskaði: Vefjaskemmd í auga eða alvarleg sjónskerðing, sem kemur fram eftir að prófunaríðefni er borið á framflöt augans, sem gengur ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun“.

Staðlaðar verklagsreglur: Formleg, skrifleg málsmeðferð þar sem því er nákvæmlega lýst hvernig á að framkvæma sértækar reglubundnar og prófunarsértækar aðgerðir á rannsóknarstofu. Þetta er krafa samkvæmt góðum starfsvenjum við rannsóknir.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (18. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófun: Stakt prófunaríðefni í samskeiða prófun á a.m.k. tveimur samhliða vefjasýnum eins og skilgreint er í samsvarandi stöðluðum verklagsreglum.

Lífvænleiki vefjar: Mæliþáttur fyrir heildarvirkni frumuhóps í endurgerðum vef sem geta þeirra til að draga úr líflitnum MTT sem samsvarar, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

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 prófunaraðferðir eru notaðar raðbundið. Allar fyrirliggjandi upplýsingar um prófunaríðefnið eru rýndar á hverju aðferðarþrepi og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga 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 hugsanlega hættu/mátt prófunaríðefnis, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga á tilteknu aðferðarþrepi, eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar (18. heimild).

ULOQ: Efri magngreiningarmörk.

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).

1. undirflokkur HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun: Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

2. undirflokkur HSK SÞ og reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun: Sjá „Augnerting“.

Utan flokks í HSK SÞ og reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun: Íðefni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SÞ/reglugerðarinnar um flokkun, merkingu og pökkun (eða undirflokk 2A eða 2B í HSK SÞ/reglugerðinni um flokkun, merkingu og pökkun). Jafngildir „Ekki flokkað“.

UPLC: Úthá þrýstivökvaskiljun.

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 (18. heimild).

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 (18. heimild).

VRM: Fullgilt viðmiðunaraðferð.

VRM1: Vísað er til EpiOcular™ EIT sem fullgiltrar viðmiðunaraðferðar 1.

VRM2: Vísað er til SkinEthic™ HCE EIT sem fullgiltrar viðmiðunaraðferðar 2.

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 prófunarefni og styðja þá niðurstöðu rökum.

2. viðbætir

HELSTU ÞÆTTIR PRÓFANA Í RHCE-PRÓFUNUM SEM ERU FULLGILTAR TIL AÐ GREINA ÍÐEFNI SEM ÞURFA EKKI FLOKKUN OG MERKINGU M.T.T. AUGNERTINGAR EÐA ALVARLEGS AUGNSKAÐA

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Aðferðarlýsingar	Vökvar (hægt að láta drjúpa úr pípettu við 37 ± 1 °C eða lægra hitastig í 15 mín)	Föst efni (ekki hægt að láta drjúpa úr pípettu)	Vökvar og seigfljótandi efni (hægt að láta drjúpa úr pípettu)	Föst efni (ekki hægt að láta drjúpa úr pípettu)
Yfirborð líkans	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Fjöldi samhliða vefjasýna	A.m.k. 2	A.m.k. 2	A.m.k. 2	A.m.k. 2
Forathugun vegna litatruflunar	50 µl + 1 ml H_2O í 60 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig (ólituð prófunaríðefni), eða 50 µl + 2 ml ísóprópanól blandað í 2–3 klst. við stofuhita (lituð prófunaríðefni) → ef ljósþéttni prófunaríðefnisins við 570 ± 20 nm, eftir að ljósþéttni fyrir ísóprópanól eða vatn hefur verið dregin frá, er > 0,08 (sem samsvarar u.þ.b. 5% af meðaltali ljósþéttni neikvæða samanburðarins) skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef.	50 mg + 1 ml H_2O í 60 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig (ólituð prófunaríðefni) og/eða 50 mg + 2 ml ísóprópanól blandað í 2–3 klst. við stofuhita (lituð og ólituð prófunaríðefni) → ef ljósþéttni prófunaríðefnisins við 570 ± 20 nm, eftir að ljósþéttni fyrir ísóprópanól eða vatn hefur verið dregin frá, er > 0,08 (sem samsvarar u.þ.b. 5% af meðaltali ljósþéttni neikvæða samanburðarins) skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef.	10 µl + 90 µl H_2O blandað í 30 ± 2 mín við stofuhita (18–28 °C) → ef prófunaríðefnið er litað skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef	10 mg + 90 µl H_2O blandað í 30 ± 2 mín við stofuhita → ef prófunaríðefnið er litað skal gera aðlagaðan samanburð með lifandi vef

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Forathugun vegna beinnar afoxunar MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu (50 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drepinn með frystingu (50 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drekkt í vatni (30 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml lausn í 180 ± 15 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig → ef lausnin verður blá/fjólublá skal gera aðlagaðan samanburð með vef sem hefur verið drekkt í vatni (30 µl af dauðhreinsuðu afjónuðu vatni í MTT-lausn eru notaðir sem neikvæður samanburður)
Formeðhöndlun	20 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn í 30 ± 2 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig, varið ljósi.	20 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn í 30 ± 2 mín við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig, varið ljósi.	—	—
Meðhöndlunarskammtar og notkun	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) með kvörðuðu áhaldi (t.d. sléttfullri skeið sem er kvörðuð þannig að hún rúmi 50 mg af natríumklóríði).	10 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Nota skal nælonmöskva fyrir seigfljótandi efni	30 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Váhrifatími og hitastig	30 mín (± 2 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig	6 klst. (± 0,25 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig	30 mín (± 2 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig	4 klst. (± 0,1 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig

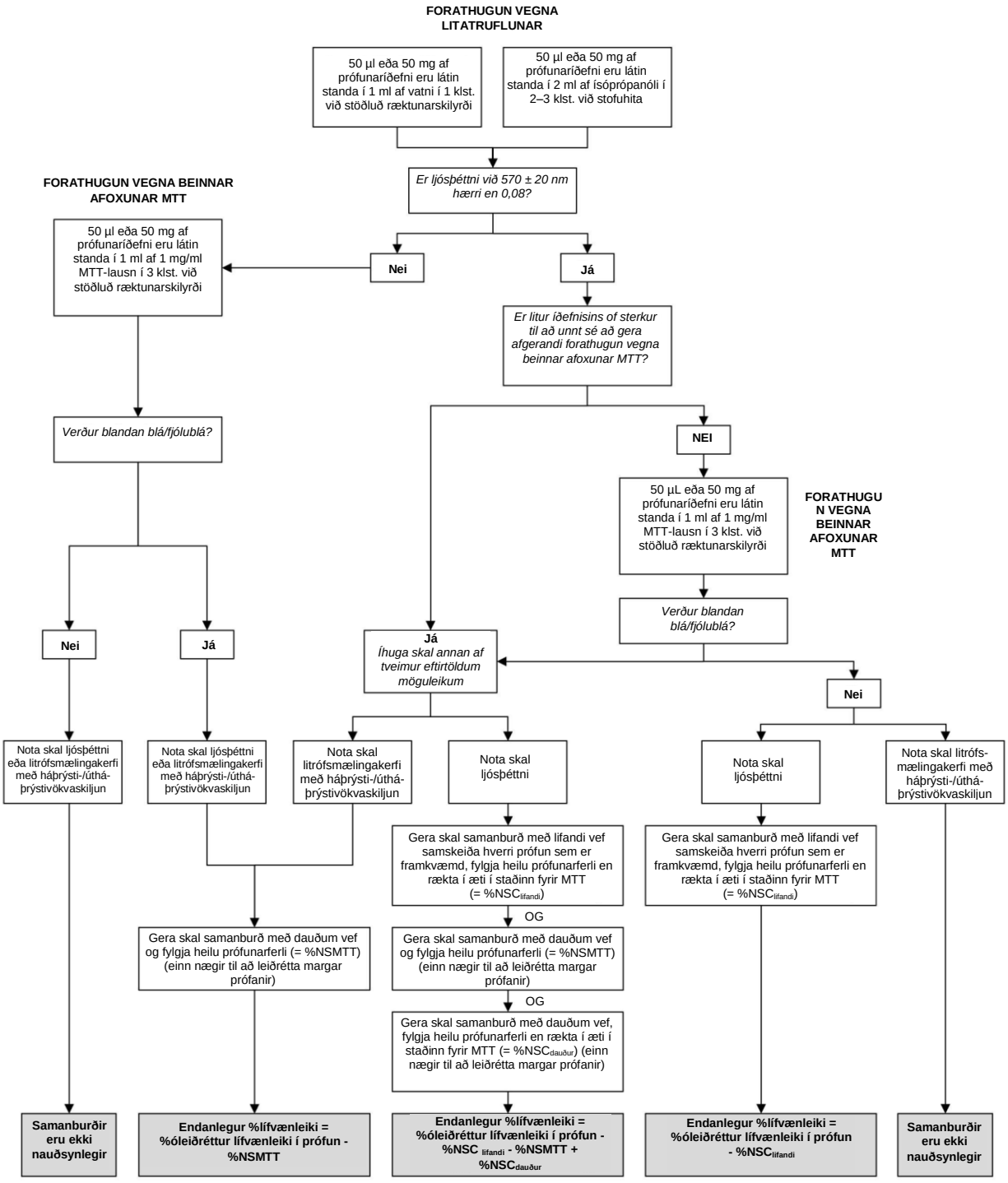
Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Skolun við stofuhita	3 sinnum í 100 ml af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn	3 sinnum í 100 ml af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn	20 ml af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn	25 ml af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn
Ídýfing eftir váhrif	12 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti	25 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti	30 mín (± 2 mín) við 37 °C, 5% CO_2, 95% rakastig í ræktunaræti	30 mín (± 2 mín) við stofuhita í ræktunaræti
Viðstaða eftir váhrif	120 mín (± 15 mín) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig	18 klst. (± 0,25 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig	Engin	18 klst. (± 0,5 klst.) í ræktunaræti við 37 ± 2 °C, 5 ± 1% CO_2, ≥ 95% rakastig
Neikvæður samanburður	50 µl H_2O Prófað samskeiða	50 µl H_2O Prófað samskeiða	30 ± 2 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn Prófað samskeiða	30 ± 2 µl af Ca^{2+}/Mg^{2+}-lausri fosfatstilltri saltlausn Prófað samskeiða
Jákvæður samanburður	50 µl metýlasetat Prófað samskeiða	50 µl metýlasetat Prófað samskeiða	30 ± 2 µl metýlasetat Prófað samskeiða	30 ± 2 µl metýlasetat Prófað samskeiða

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
MTT-lausn	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-viðstöðutími og hitastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO_2, ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO_2, ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO_2, ≥ 95% rakastig	180 mín (± 15 mín) við 37 ± 2 °C, 5±1% CO_2, ≥ 95% rakastig
Útdráttarleysir.	2 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innleggi með því að stinga gat á vefinn)	2 ml ísóprópanól (útdráttur neðan af innleggi með því að stinga gat á vefinn)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur ofan og neðan af innleggi)	1,5 ml ísóprópanól (útdráttur neðan af innleggi)
Útdráttartími og hitastig	2–3 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða yfir nótt við 4–10 °C	2–3 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða yfir nótt við 4–10 °C	4 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita eða a.m.k. yfir nótt án hristings við 4–10 °C	Að minnsta kosti 2 klst. með hristingi (~120 rpm) við stofuhita
Mæling á ljósþéttni	570 nm (550–590 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (550–590 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsíu	570 nm (540–600 nm) án viðmiðunarsíu
Gæðaeftirlit með vef	Meðhöndlun með 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100 12,2 mín ≤ ET_{50} ≤ 37,5 mín	Meðhöndlun með 100 µl af 0,3% (rúmmálshlutfall) Triton X-100 12,2 mín ≤ ET_{50} ≤ 37,5 mín	30 mín meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 mín meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Þættir prófunar	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Samþykktarviðmiðanir	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera > 0,8 og < 2,5 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 30 mín með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera <50% 3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera > 0,8 og < 2,5 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 6 klukkustundir með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera < 50% 3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera > 1,0 og ≤ 2,5 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 30 mín með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 30% 3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%	1. Meðaltal ljósþéttni samhliða vefjasýna sem eru meðhöndluð með neikvæðum samanburði skal vera > 1,0 og ≤ 2,5 2. Meðallífvænleiki samhliða vefjasýna sem eru látin verða fyrir váhrifum í 4 klst. með jákvæða samanburðinum, gefinn upp sem hundraðshlutfall neikvæða samanburðarins, skal vera ≤ 20% 3. Mismunur á lífvænleika milli tveggja samhliða vefjasýna skal vera innan við 20%

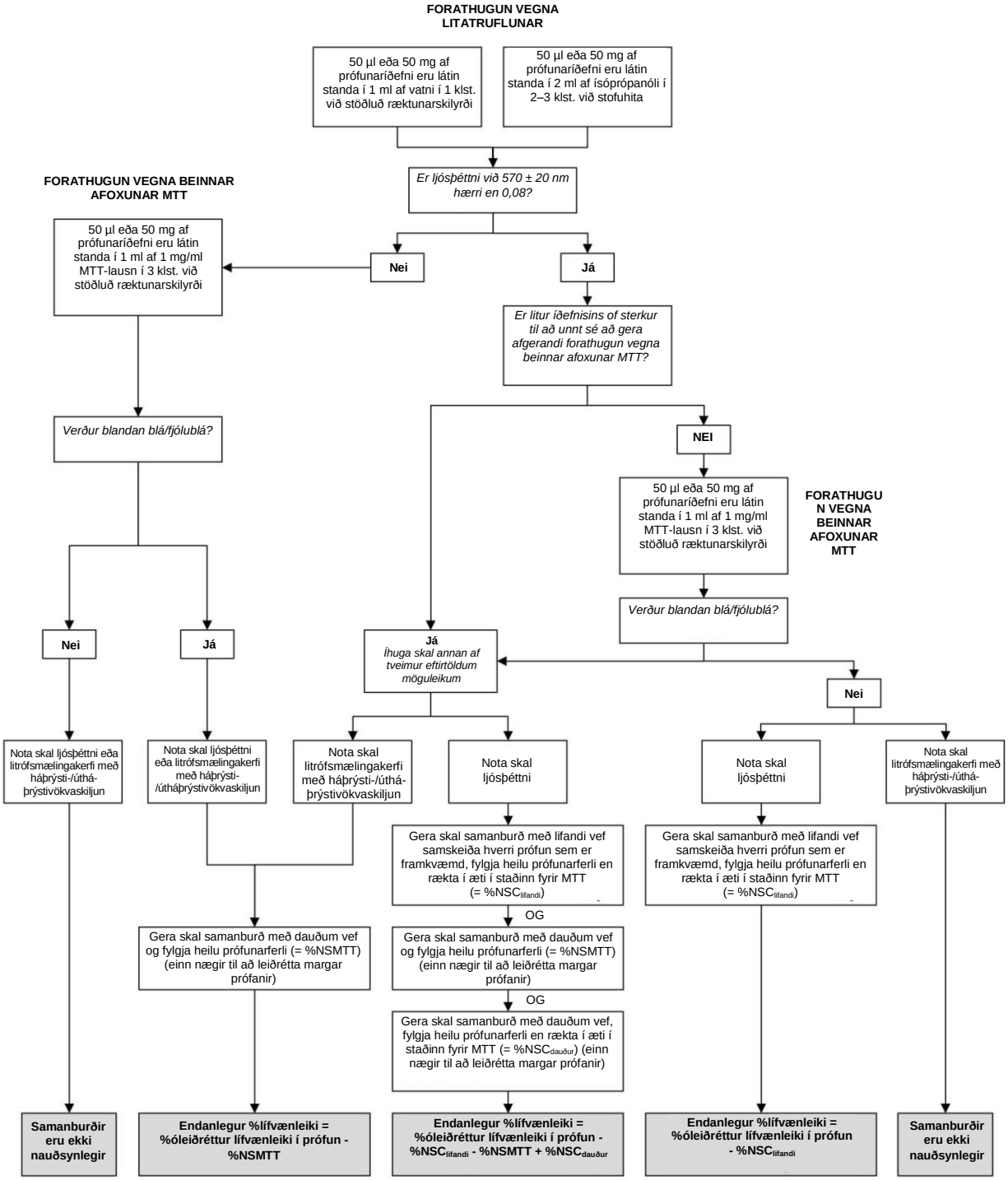
3. viðbætir

FLÆÐIRIT TIL SKÝRINGAR SEM VEITIR LEIÐBEININGAR UM HVERNIG Á AÐ GREINA OG MEÐHÖNDLA BEINA AFOXARA MTT-LITAR OG/EÐA LITATRUFLANDI ÍÐEFNI, BYGGT Á STÖÐLUÐUM VERKLAGSREGLUM FYRIR FULLGILTA VIÐMIÐUNARAÐFERÐ 1 (VRM1)



4. viðbætir

FLÆÐIRIT TIL SKÝRINGAR SEM VEITIR LEIÐBEININGAR UM HVERNIG Á AÐ GREINA OG MEÐHÖNDLA BEINA AFOXARA MTT-LITAR OG/EÐA LITATRUFLANDI ÍÐEFNI, BYGGT Á STÖÐLUÐUM VERKLAGSREGLUM FYRIR FULLGILTA VIÐMIÐUNARAÐFERÐ 1 (VRM2)



5. viðbætir

HELSTU MÆLIÞÆTTIR OG SAMÞYKKTARVIÐMIÐANIR FYRIR HÆFI LITRÓFSMÆLINGAKERFIS MEÐ HÁÞRÝSTI-/ÚTHÁÞRÝSTIVÖKVASKILJUN TIL MÆLINGAR Á MTT-FORMASANI SEM ER DREGIÐ ÚR RHCE-VEFJALÍKÖNUM

Mæliþáttur	Aðferðarlýsing úr leiðbeiningum matvæla- og lyfjaeftirlits Bandaríkjanna (36. og 38. heimild)	Samþykktarviðmiðanir
Valvísi	Greining á ísóprópanóli, lifandi blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr lifandi RhCE-vefjalíkönum án meðhöndlunar), dautt blanksýni (ísóprópanólútdráttur úr dauðum RhCE-vefjalíkönum án meðhöndlunar) og á leysilit (t.d. metýlenbláma).	Svæði$_{truflun}$ ≤ 20% af svæði$_{LLOQ}$ (1)
Samkvæmni	Gæðaeftirlit (þ.e. MTT-formasan við 1,6µg/ml, 16 µg/ml og 160 µg/ml) í ísóprópanóli (n = 5)	FS ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Nákvæmni	Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 5)	% frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ
Áhrif efniviðarins	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n = 5)	85% ≤ % áhrif efniviðarins ≤ 115%
Yfirfærsla	Greining á ísóprópanóli eftir staðli ULOQ (*)	Svæði$_{truflun}$ ≤ 20% af svæði$_{LLOQ}$
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	Þrír óháðir kvörðunarferlar (á grundvelli sex samfelldra þynninga MTT-formasans í ísóprópanól í hlutföllum 1:3, þar sem byrjað er á ULOQ, þ.e. 200 µg/ml). Gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 5)	Kvörðunarferlar: % frávika ≤ 15% eða ≤ 20% vegna LLOQ Gæðaeftirlit: % frávika ≤ 15% og FS ≤ 15%
Samanburðarnákvæmni (innan sama dags)	1. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3) 2. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3) 3. dagur: Einn kvörðunarferill og gæðaeftirlit í ísóprópanóli (n = 3)	
Skammtímastöðugleiki MTT-formasans í RhCE -vefjaútdrætti	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n = 3), greint á degi tilreiðslu og eftir 24 klst. geymslu við stofuhita	% frávika ≤ 15%
Langtímastöðugleiki MTT-formasans í RhCE -vefjaútdrætti, ef þörf krefur	Gæðaeftirlit í lifandi blanksýni (n=3), greint á degi tilreiðslu og eftir nokkurra daga geymslu við -20 °C	% frávika ≤ 15%

(1) LLOQ**:** Neðri magngreiningarmörk, skilgreind til að ná yfir 1–2% lífvænleika vefjar, þ.e. 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ**:** Efri magngreiningarmörk, skilgreind þannig að þau eru a.m.k. tvöfalt hærri en hæsti styrkur MTT-formasans í ísóprópanólútdráttum úr neikvæðum samanburðum sem búist er við (~70 µg/ml í fullgiltu viðmiðunaraðferðinni), þ.e. 200 µg/ml.

B.70 GREINING Í GLASI MEÐ ENDURRÖÐUÐUM ESTRÓGENVIÐTAKA ÚR MÖNNUM (hrER) TIL AÐ GREINA ÍÐEFNI MEÐ BINDINGASÆKNI VIÐ ESTRÓGENVIÐTAKA

ALMENNUR INNGANGUR

Viðmiðunarregla OECD um prófanir byggð á nothæfi

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 493 um prófanir (2015). Viðmiðunarregla 493 um prófanir er viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (PBTG), þar sem lýst er aðferðarfræði greininga *í glasi* með endurröðuðum viðtaka úr mönnum til að greina efni með bindingasækni við estrógenviðtaka (hrER-bindingagreiningar). Hún samanstendur af tveimur samsvarandi greiningum, með tilliti til verkunarmáta og virkni, til greiningar á efnum sem bindast estrógenviðtökum (þ.e. ERα) og ætti að auðvelda þróun nýrra samsvarandi eða breyttra greininga í samræmi við meginreglurnar um fullgildingu sem settar eru fram í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um fullgildingu og alþjóðlega staðfestingu á nýjum eða uppfærðum prófunaraðferðum fyrir hættumat (1. heimild). Fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðirnar (2. viðbætir og 3. viðbætir) sem leggja grunninn að þessari viðmiðunarreglu um prófanir byggða á nothæfi eru:

— „Freyberger-Wilson (FW) In Vitro Estrogen Receptor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ERα“ (2. heimild) og

— „The Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) In Vitro Estrogen Receptor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein“ (2. heimild).

Nothæfisstaðlar (3. heimild) eru tiltækir til að auðvelda þróun og fullgildingu svipaðra prófunaraðferða fyrir sömu endapunkta hættu og gefa færi á tímanlegum breytingum á viðmiðunarreglu 493 um prófanir byggð á nothæfi þannig að hægt sé að bæta nýjum, svipuðum greiningum við uppfærða viðmiðunarreglu um prófanir byggð á nothæfi. Þó verður svipuðum prófunargreiningum einungis bætt við eftir endurskoðun og samþykki Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir því að nothæfisstaðlar séu uppfylltir. Greiningarnar sem er að finna í viðmiðunarreglu 493 um prófanir er unnt að nota jafnt til að uppfylla kröfur landa um niðurstöður úr prófunum á bindingu við estrógenviðtaka (ER) og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar.

Bakgrunnur og meginreglur greininganna sem falla undir þessa prófunaraðferð

2. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsaðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur fyrir prófanir og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum. Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum var endurskoðaður árið 2012. Upphaflega sem og endurskoðaða hugtakarammann er að finna sem viðauka í leiðbeiningarskjali um staðlaðar viðmiðunarreglur um prófanir til að meta íðefni með tilliti til innkirtlatruflandi eiginleika (4. heimild). Hugtakaramminn samanstendur af fimm stigum, hvert stig samsvarar mismunandi stigi líffræðilegs margbreytileika. ER-bindingagreiningarnar, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, tilheyra 2. stigi sem felur í sér greiningar *í glasi* sem veita upplýsingar um valið eða valin gangvirki/valinn eða valda ferla innkirtlastarfsemi. Þessi prófunaraðferð er fyrir greiningar *í glasi* á bindingu við viðtaka og henni er ætlað að greina bindla α-estrógenviðtaka (ERα) úr mönnum.

3. Sýnt hefur verið fram á með skýrum hætti gildi ER-bindingagreiningar *í glasi* fyrir líffræðilega virkni. ER-bindingagreiningum er ætlað að greina íðefni sem geta mögulega truflað estrógenhormónaferlið og þær hafa verið mikið notaðar undanfarna tvo áratugi til að lýsa eiginleikum dreifingar estrógenviðtaka í vefjum sem og til að greina estrógenviðtakaörva/-blokka. Þessar greiningar endurspegla víxlverkun bindils-viðtaka sem er fyrsta stig estrógenboðmiðlunarleiðarinnar og nauðsynleg fyrir æxlunarstarfsemi hjá öllum hryggdýrum.

4. Víxlverkun estrógens við estrógenviðtaka (ER) getur haft áhrif á umritun estrógenstýrðra gena og kallað fram áhrif, sem tengjast ekki genamenginu, sem geta leitt til örvunar eða heftingar á frumuferlum, þ.m.t. þau sem eru nauðsynleg fyrir frumufjölgun, eðlilegan fósturþroska og æxlunarstarfsemi (5.–7. heimild). Truflun á eðlilegum estrógenvirkum kerfum getur e.t.v. komið af stað skaðlegum áhrifum á eðlilega þroskun (einstaklingsmyndun), frjósemisheilbrigði og heilleika æxlunarfærakerfisins. Óviðeigandi boðmiðlun estrógenviðtaka geta leitt til áhrifa s.s. aukinnar áhættu á hormónaháðu krabbameini, skertrar frjósemi og breytinga á vexti og þroskun fósturs (8. heimild).

5. Bindingagreiningar *í glasi* byggjast á beinni víxlverkun efnis við tiltekinn bindistað fyrir viðtakabindil sem stýrir genaumrituninni. Lykilþátturinn í bindingagreiningu á endurröðuðum viðtaka fyrir α-estrógen úr mönnum (hrERα) er að mæla getu geislamerkts bindils ([3H]17β-estradíól) til að bindast estrógenviðtaka við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis (þ.e. samkeppni um bindingu). Prófunaríðefni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerkta bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettunarbindingatilraun (e. *saturation binding experiment*) til að lýsa eiginleikum breyta í víxlverkun milli viðtaka og bindils og skrá ER-sértækið og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun (e. *competitive binding experiment*) sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðefnis og geislamerkts bindils við bindingu við ER.

6. Sýnt hefur verið fram á gildi og áreiðanleika CERI- og FW-bindingagreininganna fyrir ætlaðan tilgang þeirra með fullgildingarrannsóknum (2. heimild).

7. Skilgreiningar og skammstafanir sem notaðar eru í þessari prófunaraðferð eru settar fram í 1. viðbæti.

Gildissvið og takmarkanir í tengslum við viðtakabindingargreiningar

8. Lagt er til að þessar greiningar séu notaðar við skimun og forgangsröðun en þær geta einnig veitt upplýsingar um sameindaræsingu sem hægt er að nota við greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þær varða bindingu íðefnis við bindisvæði ERα-bindilsins í prófunarkerfi *í glasi*. Niðurstöðurnar skal því ekki yfirfæra beint á flókin boð og stýringu óskaddaða innkirtlakerfisins í lífi.

9. Binding náttúrulega bindilsins 17β-estradíóls er fyrsta stigið í röð sameindaviðburða sem virkja umritun markgena og ná að lokum hámarki með lífeðlisfræðilegri breytingu (9. heimild). Þar af leiðandi telst binding við bindisvæði ERα-bindilsins vera eitt af lykilgangvirkjum estrógenviðtakabundinnar innkirtlatruflunar þó að innkirtlatruflun geti orsakast vegna annarra gangvirkja, þ.m.t. eru i. víxlverkanir við önnur ERα-svæði en bindingargróp (e. *binding pocket*) bindilsins, ii. víxlverkanir við aðra viðtaka sem skipta máli fyrir boðmiðlun estrógens, ERβ-viðtaka og G-prótíntengda estrógenviðtaka, aðra viðtaka og ensímkerfi innan innkirtlakerfisins, iii. hormónanýmyndun, iv. efnaskiptavirkjun og/eða óvirkjun hormóna, v. dreifing hormóna í markvefi og vi. úthreinsun hormóna úr líkamanum. Engin greininganna í þessari prófunaraðferð varðar þessa verkunarhætti.

10. Þessi prófunaraðferð varðar getu efna til að bindast viðtaka fyrir α-estrógen (ERα) úr mönnum og gerir ekki greinarmun á ERα-örvum eða -blokkum. Þessi greining varðar ekki heldur frekari atburði þar fyrir aftan, s.s. genaumritun eða lífeðlisfræðilegar breytingar. Að teknu tilliti til þess að einungis stök efni með einum efnisþætti voru notuð í fullgildingunni hefur ekki verið fjallað um nothæfið fyrir prófunarblöndur. Fræðilega séð teljast greiningarnar samt sem áður nothæfar 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 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.

11. Frumulaus viðtakakerfi eru ekki með eðlislæga efnaskiptagetu og þau voru ekki fullgilt í samsetningu með efnaskiptaensímkerfum. Þó er mögulega hægt að fella ensímvirkni inn í hönnun rannsóknar en slíkt myndi útheimta frekara framtak til fullgildingar.

12. Ekki má prófa íðefni sem geta mengað prótínið (þ.e. viðtakaprótín), s.s. yfirborðsvirkt efni eða íðefni sem geta breytt sýrustigi greiningarjafnalausnarinnar, eða þá að einungis má prófa þau í styrk sem er laus við slíkar víxlverkanir. Að öðrum kosti myndi styrkbilið, sem hægt er að prófa í greiningunum fyrir prófunaríðefni, takmarkast af leysni þess í greiningarjafnalausninni.

13. Prófunarniðurstöðurnar fyrir efnin 24, sem voru prófuð í báðum fullgiltu greiningunum sem lýst er í þessari prófunaraðferð, eru gefnar upp í töflu 1 í upplýsingaskyni. Byggt á birtum skýrslum, þ.m.t. um greiningar í glasi á ER-umritunarvirkjun og/eða greiningunni á legörvun (9.–15. heimild), eru 17 af þessum efnum flokkuð sem efni sem bindast estrógenviðtaka (ER) og 6 sem efni sem bindast ekki. Að því er varðar gögnin sem eru tekin saman í töflu 1 var næstum því 100% samkvæmni milli greininganna tveggja varðandi flokkun allra efnanna upp að 10^{-4}M og hvert efni var rétt flokkað sem efni sem binst eða binst ekki ER. Viðbótarupplýsingar um þennan flokk efna, sem og um viðbótarefni sem voru prófuð í estrógenviðtakabindingagreiningum (ER-bindingagreiningum) í fullgildingarrannsóknunum, koma fram í nothæfisstöðlum fyrir hrER-bindingagreininguna (3. heimild) í 2. viðbæti (töflur 1, 2 og 3).

Tafla 1

Flokkun í efni sem bindast eða bindast ekki við estrógenviðtaka (ER) samkvæmt prófun í FW- og CERI-hrER-bindingagreiningum ásamt samanburði við þá svörun sem búist er við

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búist var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-íðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
1	17β-estradíól	50-28-2	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
2	Noretýnódrel	68-23-5	Binst	$3x10^{-9}$–$30x10^{-4}$	Binst	$3x10^{-9}$–$30x10^{-4}$	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
3	Noretíndrón	68-22-4	Binst	$3x10^{-9}$–$30x10^{-4}$	Binst	$3x10^{-9}$–$30x10^{-4}$	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
4	Dí-n-bútýlþalat	84-74-2	Binst ekki (*)	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki (**) (†)	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki (**) (†)	Vetniskolefni (hringað), estri	Mýkiefni, milliefni
5	DES	56-53-1	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
6	17α-etýnýlestradíól	57-63-6	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
7	Mesó-Hexestról	84-16-2	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
8	Genistein	446-72-0	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni (hringað), flavonóíð	Náttúruvara
9	Ekvól	531-95-3	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Plöntuestrógenumbrotsefni	Náttúruvara
10	Bútýlparaben (n-bútýl-4-hýdroxýbensóat)	94-26-8	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Paraben	Rotvarnarefni

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búist var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-íðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
11	Nónýlefnól (blanda)	84852-15-3	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Alkýlfenól	Milliefni
12	o,p'-DDT	789-02-6	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Lífræn klórsambönd	Skordýraeitur
13	Kortikósterón	50-22-6	Binst ekki (*)	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	Steri	Náttúruvara
14	Searalenón	17924-92-4	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni (hringað), laktón	Náttúruvara
15	Tamoxífen	10540-29-1	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni, (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
16	5α-díhýdrótestósterón	521-18-6	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Steri, ekki fenól	Náttúruvara
17	Bisfenól A	80-05-7	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Fenól	Milliefni
18	4-n-heptýlfenól	1987-50-4	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Tvíræð ([a])	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Alkýlfenól	Millihraði
19	Kepón (klórdekón)	143-50-0	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Vetniskolefni, (halógenað)	Plágueyðir
20	Bens[a]antrasen	56-55-3	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst ekki ([b])	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst ekki ([b])	Arómatísk vetniskolefni	Millihraði
21	Enterólaktón	78473-71-9	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst	Plöntuestrógen	Náttúruvara
22	Prógesterón	57-83-0	Binst ekki (*)	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	Steri	Náttúruvara

	Efnaheiti	CAS-númer	Svörun sem búist var við	FW-greining		CERI-greining		MeSH-íðefnaflokkur	Vöruflokkur
				Styrkbil (M)	Flokkun	Styrkbil (M)	Flokkun		
23	Oktýltríetoxýsílan	2943-75-1	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Binst ekki	Sílan	Yfirborðsbreytiefni
24	Atrasín	1912-24-9	Binst ekki (*)	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Binst ekki	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir

(*) Leysnimörk < $1x\ 10^{-4}$M.

(**) Notkun og flokkun á dí-n-bútýlþalati (DBP) sem efni sem binst ekki var byggt á prófun allt upp að 10^{-4} M af því að komið hafði í ljós á nokkrum rannsóknarstofum í forfullgildingarrannsóknunum að efnið var óleysanlegt við 10^{-3}M (t.d. grugg).

(†) Í fullgildingarrannsókninni var dí-n-bútýlþalat (DBP) prófað sem kóðað prófunarefni í styrk sem nam allt að 10^{-3}M. Við þessi skilyrði kom í ljós á nokkrum rannsóknarstofum annað hvort minnkun á bindingu geislamerkts bindils við hæsta styrk (10^{-3}M) og/eða tvíræð ferilaðlögun. Í þessum keyrslum var dí-n-bútýlþalat (DBP) flokkað sem „tvírætt“ eða „binst“ í 3/5 rannsóknarstofum sem notuðu CERI-greininguna og í 5/6 rannsóknarstofum sem notuðu FW-greininguna (sjá tilvísun (2. heimild), a- og b-lið 3 liðar í B-lið í IV. þætti og A-lið VI. liðar).

([a]) Flokkunin var ekki í samræmi við þá flokkun sem búist var við. Flokkun 4-n-heptýlfenóls sem „tvírætt“ eða „binst ekki“ í 3/5 rannsóknarstofum leiddi af sér meðalflokkun sem „tvírætt“. Nánari skoðun leiddi í ljós að þetta stafaði af takmörkunum á leysni íðefnis sem kom í veg fyrir að ferillinn sýndi fulla bindingu.

([b]) Í fullgildingarrannsókninni var bens[a]antrasen endurflokkað sem efni sem binst ekki (þ.e. neikvætt) á grundvelli birtra skrifa þar sem sýnt er fram á að estrógenlík virkni *í glasi* sem greint var frá vegna þessa efnis byggist fyrst og fremst á efnaskiptavirkjun þess. Ekki er gert ráð fyrir ensímefnaskiptavirkjun efnisins í frumulausum hrER-bindingagreiningum eins og eru notaðar í þessum fullgildingum milli stofa. Þar af leiðandi er rétt flokkun á þessu efni „binst ekki“ þegar það er notað við tilraunaskilyrði í FW- og CERI-greiningum.

ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR

Grundvallarþættir greiningar

14. Þessi prófunaraðferð gildir um greiningar þar sem notaðir eru ER-viðtaki og hæfilega sterkur bindill fyrir viðtakann sem hægt er að nota sem marka/sporefni fyrir greininguna og sem hægt er að ryðja burtu við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Bindingagreiningar innihalda eftirfarandi tvo mikilvæga þætti: 1) mettunarbindingu og 2) samkeppnisháða bindingu. Mettunarbindingagreining er notuð til að staðfesta sértæki og virkni viðtökuefnablandna en samkeppnisháð bindingatilraun er notuð til að meta getu prófunaríðefnis til að bindast hrER.

Samanburðir

15. Lýsa skal grundvellinum fyrir tillagt samskeiða viðmiðunarestrógen og samanburði. Samskeiða samanburðir (leysir (burðarefni), jákvætt (efni sem binst ER; sterk og veik sækni), neikvætt (efni sem binst ekki)), eins og við á, gefa vísbendingu um að greiningin er virk við prófunarskilyrðin og eru grundvöllur fyrir samanburð á tilraunum; þeir eru yfirleitt hluti af viðmiðunum fyrir ásættanleika fyrir tiltekna tilraun (1. heimild). Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: 1) háan (geislamerktum bindli u.þ.b. alveg rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC_{50}) styrk af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hverju; 2) samanburð með leysi og ósértæku bindiefni, þrjú sett af hverju.

Staðlað verklag við gæðaeftirlit

16. Staðlað verklag við gæðaeftirlit skal framkvæmt eins og lýst er fyrir hverja greiningu til að tryggja að viðtakar séu virkir, rétta styrkleika íðefna, að vikmarkamörkin haldist stöðug gegnum margar endurtekningar og til að halda getunni til að veita þá ER-bindingasvörun sem búist var við yfir lengri tíma.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu

17. Áður en óþekkt íðefni eru prófuð með einhverri af greiningunum í þessari prófunaraðferð skal hver rannsóknarstofa sýna fram á hæfni við notkun greiningarinnar með því að framkvæma mettunargreiningar til að staðfesta sértæki og virkni ER-efnablöndunnar og samkeppnisháðar bindingagreiningar með viðmiðunarestrógeninu og samanburðunum (efni sem binst veikt og efni sem binst ekki). Rannsóknarstofan skal koma á fót sögulegum gagnagrunni með niðurstöðum um viðmiðunarestrógenið og samanburðina sem verða til úr 3 til 5 sjálfstæðum tilraunum sem eru gerðar á mismunandi dögum. Þessar tilraunir verða grunnur rannsóknarstofunnar fyrir viðmiðunarestrógenið og rannsóknarsögulega samanburði og verða notaðar sem mat að hluta til á ásættanleika greiningarinnar fyrir keyrslur í framtíðinni.

18. Svörunargeta prófunarkerfisins verður einnig staðfest með því að prófa hæfnisefnin sem eru talin upp í töflu 2. Skráin yfir hæfnisefnin er hlutmengi viðmiðunarefnanna sem eru tilgreind í nothæfisstöðlunum fyrir ER-bindingagreiningarnar (3. heimild). Þessi efni fást á almennum markaði, eru úr þeim flokkum íðefna sem eru almennt tengdir ER-bindingavirkni, sýna viðeigandi mátt fyrir þann styrk sem búist var við fyrir efni sem bindast ER (þ.e. sterk yfir í veik) eða ekki (þ.e. neikvæð). Að því er varðar hvert hæfnisefni skulu styrkleikarnir sem eru prófaðir spanna styrkbilin sem eru gefin upp í töflu 2. Gera skal a.m.k. þrjár tilraunir fyrir hvert efni og niðurstöðurnar skulu vera í samræmi við þá virkni íðefnisins sem búist var við. Hver tilraun skal gerð aðskilið (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefni) með þremur samhliða prófunum fyrir hvern styrkleika. Sýnt er fram á hæfni með réttri flokkun (jákvætt/neikvætt) á hverju hæfnisefni. Hver tæknimaður skal framkvæma hæfnisprófun þegar hann lærir á greiningarnar.

Tafla 2

Skrá yfir samanburði og hæfnisefni fyrir samkeppnisháðar hrER-bindingagreiningar ([1])

Nr.	Efnaheiti	CAS-númer ([2])	Svörun sem búist var við ([3]) ([4])	Styrkbil prófunar (M)	MeSH-íðefnaflokkur ([5])	Vöruflokkur ([6])
			Samanburðir (viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt, binst ekki)			
1	17ß-estradíól	50-28-2	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
2	Noretýnódrel eða noretíndrón	68-23-5 (eða) 68-22-4	Binst	$3x10^{-9}$–$30x10^{-6}$	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
3	Oktýltríetoxýsílan	2943-75-1	Binst ekki	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Sílan	Yfirborðsbreytiefni
			Hæfnisefni ([6])			
4	Díetýlstilbóestról	56-53-1	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
5	17α-etýnýlestradíól	57-63-6	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Steri	Lyf, efni til dýralækninga
6	Mesó-Hexestról	84-16-2	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Vetniskolefni (hringað), fenól	Lyf, efni til dýralækninga
7	Tamoxífen	10540-29-1	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Vetniskolefni (hringað)	Lyf, efni til dýralækninga
8	Genistein	446-72-0	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Heturhringliða samband, flavonóíð	Náttúruvara

Nr.	Efnaheiti	CAS-númer ([2])	Svörun sem búist var við ([3]) ([4])	Styrkbil prófunar (M)	MeSH-íðefnaflokkur ([5])	Vöruflokkur ([6])
9	Bisfenól A	80-05-7	Binst	$1x10^{-10}$–$1x10^{-3}$	Fenól	Milliefni
10	Searalónón	17924-92-4	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-3}$	Heturhringliða samband, laktón	Náttúruvara
11	Bútýlparaben	94-26-8	Binst	$1x10^{-11}$–$1x10^{-3}$	Karboxýlsýra, fenól	Rotvarnarefni
12	Atrasín	1912-24-9	Binst ekki	$1x10^{-11}$–$1x10^{-6}$	Heturhringliða samband	Illgresiseyðir
13	Dí-n-bútýlþalat (DBP) ([7])	84-74-2	Binst ekki ([8])	$1x10^{-10}$–$1x10^{-4}$	Vetniskolefni (hringað), estri	Mýkiefni, milliefni
14	Kortikósterón	50-22-6	Binst ekki	$1x10^{-11}$–$1x10^{-4}$	Steri	Náttúruvara

([1]) Ef hæfnisefni fæst ekki lengur á almennum markaði er hægt að nota efni með sömu flokkun ER-bindinga, sambærilegan mátt og íðefnaflokk.
([2]) Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni.
([3]) Flokkun sem efni sem binst ERα eða efni sem binst því ekki í fullgildingarrannsókninni fyrir CERI- og FW-hrER-bindingagreiningarnar.
([4]) ER-bindingavirknin var byggð á bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða á ER-bindingagreiningum og TA-greiningum (9. heimild) sem og á gögnum sem byggð eru á athugunum og öðrum upplýsingum úr birtum og endurskoðuðum rannsóknum sem vísað er til (10.–15. heimild).
([5]) Efnin voru flokkuð í einn eða fleiri íðefnaflokka með því að nota alþjóðlega þekkt flokkunarkerfi U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Efnin voru flokkuð í einn eða fleiri vöruflokka með því að nota gagnagrunn U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (aðgengilegt á: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
([7]) Hægt er að nota dí-n-bútýlþalat (DBP) til samanburðar sem staðgönguefni sem binst ekki, prófað í hámarksstyrk sem nemur 10^{-4} M.
([8]) Leysnimörk fyrir þetta efni eru 10^{-4} M. Notkun og flokkun á dí-n-bútýlþalati (DBP) sem efni sem binst ekki voru byggðar á prófun allt upp að 10^{-4} M af því að komið hafði í ljós á nokkrum rannsóknarstofum í forfullgildingarrannsóknunum að efnið var óleysanlegt við 10^{-3}M (t.d. grugg).

Prófun á leysni og ákvörðun á styrkbili prófunaríðefna

19. Framkvæma skal upphafsprófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar prófunin er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkurinn sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarannsókn samanstendur af samanburði með leysi ásamt log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall. Styrkleikar í annarri og þriðju tilraun skulu aðlagaðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika prófunarkeyrslu

20. Samþykki eða höfnun prófunarkeyrslu byggist á matinu á niðurstöðunum sem fást fyrir viðmiðunarestrógen og samanburði sem notaðir eru fyrir hverja tilraun. Í fyrsta lagi skulu allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarsamanburðarins í hverri tilraun með bakka 1 vera í samræmi við mælingar á frammistöðu með ferilaðlögunarbreytum (t.d. IC_{50} og Hill-hallagildi), byggt á niðurstöðunum sem greint er frá varðandi viðkomandi aðferðarlýsingar fyrir CERI- og FW-greiningarnar (2. og 3. viðbætir), og rannsóknarsögulegum samanburðargögnum frá rannsóknarstofunni sem framkvæmdi prófunina. Allur samanburður (viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og binst ekki) skal vera flokkaður á réttan hátt fyrir hverja tilraun. Í öðru lagi þarf að meta samanburði á öllum síðari bökkum m.t.t. samkvæmni við bakka 1. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunaríðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhliða prófunum á hverjum styrkleika prófunaríðefnisins sem og í sjálfstæðu keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Sýna skal fram á getu til að framkvæma greininguna með samræmdum hætti með því að þróa og viðhalda sögulegum gagnagrunni fyrir viðmiðunarestrógen og samanburði. Nota má staðalfrávik eða fráviksstuðla fyrir meðaltal ferlanna fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt, og eru í samræmi við mæliþætti úr mörgum tilraunum, sem mælikvarða á samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu. Nota skal sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr bakkasamanburði úr hverri keyrslu sem og með hverju prófunaríðefni.

Að auki skal uppfylla eftirfarandi meginreglur varðandi viðmiðanir fyrir ásættanleika:

— Gögnin skulu vera nægileg fyrir megindlegt mat á bindingu við ER

— Styrkleikarnir sem eru prófaðir skulu vera innan leysnisviðs prófunaríðefnisins

Greining gagna

21. Skilgreint verklag fyrir greiningu gagna um mettunarbindingu og samkeppnisháða bindingu skulu vera í samræmi við helstu meginreglur um lýsingu á eiginleikum víxlverkunar milli viðtaka og bindils. Yfirleitt eru gögn um mettunarbindingu greind með því að nota ólínulegt aðhvarfslíkan þar sem tekið er tillit til samanlagðrar bindingar og ósértækrar bindingar. Við ákvörðun á hámarksfjölda bindistaða (Bmax) og klofnunarfasta (Kd) getur verið nauðsynlegt að leiðrétta fyrir bindlatæmingu (e. *ligand depletion*) (t.d. Swillens, 1995 (19. heimild)). Gögnum úr samkeppnisháðum bindingagreiningum er yfirleitt umbreytt (t.d. hundraðshlutfall sértækrar bindingar og styrkur prófunaríðefnis (log M)). Ákvarða skal áætlað $\log(IC_{50})$ fyrir hvert prófunaríðefni með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum. Eftir upphaflega greiningu skal fá fram ferilaðlögunarbreytur og gera sjónræna skoðun á því hversu vel bindingagögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar. Í sumum tilvikum kann að vera þörf á viðbótargreiningum til að fá bestu ferilaðlögunina (t.d. topp- og/eða botnþvingun ferilsins, notkun á 10% reglunni, sjá 4. viðbæti og 2. heimild (2. liður A-liðar í III. lið).

22. Þegar viðmiðanir fyrir ásættanleika (20. liður) eru uppfylltar bendir það til þess að greiningarkerfið starfi á tilhlýðilegan hátt en það tryggir ekki að tiltekið próf gefi nákvæm gögn. Endurtekning réttra niðurstaðna úr fyrsta prófinu er besta vísbendingin um að nákvæm gögn hafi fengist.

Almennar viðmiðanir um túlkun gagna

23. Sem stendur er ekki til nein aðferð sem ríkir einhugur um til að túlka gögn um bindingu við ER. Bæði megindleg (t.d. efni sem binst/binst ekki) og/eða eigindleg (t.d. log IC_{50}, hlutfallsleg bindingasækni (RBA) o.s.frv.) möt á hrER-bundinni virkni skulu þó byggð á gögnum sem byggð eru á athugunum og traustu vísindalegu mati.

Prófunarskýrsla

24. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Greining:

— greining sem er notuð,

Samanburður/viðmiðunarefni/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 ræktunarætinu 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 og burðarefni:

— lýsing á eiginleikum (eðli, birgir og lota),

— rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þekkt.

Viðtakar:

— uppruni viðtaka (birgir, verðlistanr., lota, tegundir viðtaka, styrkur virks viðtaka sem birgir lætur í té, vottun frá birgi),

— lýsing á eiginleikum viðtaka (þ.m.t. niðurstöður mettunarbindingar): Kd, Bmax,

— geymsla viðtaka,

— geislamerktur bindill:

— birgir, verðlistanr., lota, eðlisvirkni.

Prófunarskilyrði:

— takmarkanir á leysni við greiningarskilyrði,

— samsetning bindijafnalausnar,

— styrkur viðtaka,

— styrkur sporefnis (þ.e. geislamerkts bindils),

— styrkur prófunaríðefnis,

— hundraðshlutfall burðarefnis í lokagreiningunni,

— viðstöðuhitastig og -lengd sýnisins,

— aðferð við bundinn/óbundinn aðskilnað,

— neikvæð(ir) og jákvæð(ir) samanburðir/viðmiðunarefni,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar,

Ásættanleikaathugun:

— raunveruleg gildi IC_{50} og Hill-hallatölu fyrir samskeiða jákvæð(a) samanburði/viðmiðunarefni.

Niðurstöður:

— óunnin gögn og bundin/óbundin gögn,

— staðfestingarathugun á mengun, ef við á,

— lægsti hrifstyrkur, ef hann er fyrir hendi,

— hlutfallsleg bindisækni og/eða IC_{50}-gildi, eins og við á,

— tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef til eru, ásamt mælingu á skekkju og öryggi (t.d. staðalskekkja meðaltals, staðalfrávik, frávíksstuðlar eða 95% öryggisbil) og lýsing á því hvernig þessi gildi voru fengin.

Umfjöllun um niðurstöðurnar:

— beiting 10% reglunnar.

Ályktun

HEIMILDIR

1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: bls. 20-6.

6) Welboren W.J., et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer., 16(4): bls. 1073-89.

7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): bls. 63-6.

8) Diamanti-Kandarakis et al. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: In Vitro Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

12) Akahori Y. et al. (2008). Relationship Between the Results of In Vitro Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and In Vivo Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, Toxicol. In Vitro, 22(1): 225-231.

13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. bls. 1-188.

15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. Toxicol. Letters, 180: 213-221.

17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. Toxicol. and Applied Pharmacol., 196: 58-67.

18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

1. viðbætir

SKILGREININGAR OG SKAMMSTAFANIR

10% reglan: Sá möguleiki að undanskilja gagnapunkta úr greiningunni þegar meðaltal samhliða prófana fyrir hundraðshlutfall sértækrar [3H]17β-estradíólbindingar er 10% eða meira yfir því sem kemur fram fyrir meðalgildið við lægri styrk (sjá 4. viðbæti).

Viðmiðanir fyrir ásættanleika: Lágmarksstaðlar fyrir nothæfi tilraunasamanburða og viðmiðunarstaðla. Allar viðmiðanir fyrir ásættanleika skulu uppfylltar til að tilraun teljist gild.

Nákvæmni (samsvörun): Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktum viðmiðunargildum niðurstöður úr greiningu eru. Þetta er mælikvarði á nothæfi greiningar og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr greiningu (1. heimild).

CF: Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi efnum (e. *The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters*).

Íðefni: Efni eða blanda.

FS: Frávikssstuðull.

E2: 17β-estradíól.

IT: Innkirtlatruflun.

hERα: Alfa-estrógenviðtaki í manneskjum.

ER: Estrógenviðtaki.

Estrógenlík virkni: Geta efnis til að herma eftir 17β-estradíóli að því er varðar hæfni þess til að bindast estrógenviðtökum. Hægt er að greina bindingu við hERα með þessari prófunaraðferð.

IC50: Hálfur hámarkshrifstyrkur heftandi prófunaríðefnis.

ICCVAM: Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM-nefndin).

Samanburðarnákvæmni milli stofa: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu efnum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og megindlega samsvarandi. Samanburðarnákvæmni milli stofa, einnig kölluð fjölsetrasamanburðarnákvæmni, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja greiningu með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (1. heimild).

Samanburðarnákvæmni innan stofu: Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að fá sömu niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð „einseturssamanburðarnákvæmni“ (1. heimild).

LEC: Minnsti hrifstyrkur (e. *lowest effective concentration*) er minnsti styrkur prófunaríðefnis sem kallar fram svörun (þ.e. minnsti styrkur prófunaríðefnisins sem veldur tölfræðilegum mun á margfeldisaukningu vakningar miðað við samskeiða burðarefnissamanburðinn).

Hliðstæð prófun (e. *Me-too test*): Heiti úr talmáli á greiningu sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“.

PBTG: Viðmiðunarregla um prófanir byggð á nothæfi (e. *Performance-Based Test Guideline*).

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgiltri prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar greiningar sem er samsvarandi fullgiltu greiningunni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru 1) grundvallarþættir greiningarinnar, 2) lágmarksskrá yfir viðmiðunaríðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásættanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og 3) gildin fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu greiningunni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunaríðefni (1. heimild).

Hæfnisefni: Hlutmengi viðmiðunarefnanna í nothæfisstöðlunum sem rannsóknarstofur geta notað til að sýna fram á tæknilega færni með staðlaðri greiningu. Valviðmiðanir að því er varðar þessi efni fela að jafnaði í sér að þau séu dæmigerð fyrir svörunarsviðið, séu fáanleg á markaði og að með þeim séu tiltæk hágæða tilvísunargögn.

Hæfni: Sú geta sem sýnt er fram á til að framkvæma greiningu á tilhlýðilegan hátt fyrir prófun á óþekktum efnum.

Viðmiðunarestrógen: 17ß-estradíól (E2, CAS-númer 50-28-2).

Viðmiðunarprófunaraðferðir: Greiningarnar sem viðmiðunarregla 493 um prófanir byggð á nothæfi byggir á.

RBA: Hlutfallsleg bindingasækni (e. *Relative Binding Affinity*). Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) efnis er reiknuð út sem hundraðshlutfall log(IC50) fyrir efnið í hlutfalli við log(IC50) fyrir 17β-estradíól.

Gildi: Lýsing á sambandi greiningar og áhrifanna sem miðað er við og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki greiningin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) greiningar (1. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma greiningu með samanburðarnákvæmni innan og milli mismunandi rannsóknarstofa yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Hann er metinn með því að reikna út samanburðarnákvæmni innan stofu og milli stofa.

SD: Staðalfrávik.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Fullgilt prófunaraðferð: Greining 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 ásættanleg fyrir fyrirhugaðan tilgang (1. heimild).

Fullgilding: Ferlið sem staðfestir áreiðanleika og gildi tiltekinnar nálgunar, aðferðar, greiningar, verklags eða mats í skilgreindum tilgangi.

2. viðbætir.

FREYBERGER-WILSON-GREININGAR Í GLASI Á ESTRÓGENVIÐTAKAMETTUN (ERα) OG SAMKEPPNISHÁÐRI BINDINGU MEÐ NOTKUN Á ENDURRAÐAÐS ERα Í FULLRI LENGD

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu *í glasi* á estrógenviðtakamettun og samkeppnisháðri bindingu er notuð full lengd α-estrógenviðtaka (ERα) í mönnum (hrERα) sem er framleiddur í og einangraður úr bakúlóveirusýktum skordýrafrumum. Aðferðarlýsingin, sem Freyberger og Wilson þróuðu, fór í gegnum alþjóðlega fullgildingarrannsókn hjá mörgum rannsóknarstofum (2. heimild) sem sýndi fram á gildi hennar og áreiðanleika í fyrirhuguðum tilgangi greiningarinnar.

2. Þessi greining er kembirannsókn til að greina efni sem geta bundist við hrERα í fullri lengd. Hún er notuð til að ákvarða getu prófunaríðefnis til að keppa við 17β-estradíól um bindingu við hrERα. Megindlegar greiningarniðurstöður geta náð yfir IC50 (mæling á styrk prófunaríðefnis sem þörf er á til að ryðja helmingnum af [3H]-17β-estradíólinu burtu frá hrERα) og hlutfallslega bindingasækni prófunaríðefna við hrERα samanborið við 17β-estradíól. Af ástæðum sem varða efnafræðilegar kembirannsóknir geta ásættanlegar eigindlegar niðurstöður úr greiningum náð yfir flokkun á prófunaríðefnum í efni sem bindast hrERα, bindast ekki eða binding er tvíræð, á grundvelli viðmiðana sem lýst er fyrir bindingarferlana.

3. Í greiningunni er notaður geislavirkur bindill sem útheimtir að rannsóknarstofan sé með leyfi fyrir geislavirkum efnum. Allt verklag í tengslum við geislavirkar samsætur og hættuleg íðefni skal fylgja reglugerðum og verklagsreglum eins og lýst er í landslöggjöf.

4. Lesa skal „**ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir, sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir, koma fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLUR GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Bindingagreiningin hrERα mælir getu geislamerkts bindils ([3H]17β-estradíól) til að bindast estrógenviðtaka (ER) við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis (þ.e. keppinautar um bindingu). Prófunaríðefni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerkta bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann.

6. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettunarbindingatilraun til að lýsa eiginleikum mæliþátta fyrir víxlverkun milli viðtaka og bindils og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðefnis og geislamerkts bindils við bindingu við estrógenviðtakann (ER).

7. Tilgangurinn með mettunarbindingatilrauninni er að lýsa einkennum tiltekinnar lotu af viðtökum m.t.t. bindingasækni og fjölda til undirbúnings fyrir samkeppnisháðu bindingatilraunina. Í mettunarbindingatilrauninni eru mæld, við jafnvægisaðstæður, sækni estrógenviðtaka með föstum styrk í náttúrulegan bindil sinn (táknaður með klofnunarfasta (Kd)) og styrkur virkra viðtakasvæða (Bmax).

8. Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld sækni efnis til að keppa við [3H]17β-estradíól um bindingu við estrógenviðtakann (ER). Sæknin er magngreind með styrk prófunaríðefnis sem, við jafnvægi, heftir 50% af sértækri bindingu [3H]17β-estradíóls (kallað „heftistyrkur 50%“ eða IC_{50}). Þetta er einnig hægt að meta með því að nota hlutfallslega bindingasækni (RBA í hlutfalli við IC_{50} fyrir estradíól mælt aðskilið í sömu keyrslu). Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld binding [3H]17β-estradíóls við fastan styrk með breiðu sviði (átta tugaþrep) prófunaríðefnisstyrkleika. Síðan eru gögnin aðlögðuð, ef unnt er, í samræmi við Hill-jöfnuna (Hill, 1910) sem lýsir því hvernig samkeppnisháður bindill, sem binst við einn stað, ryður geislamerkta bindlinum burtu. Umfang þess að geislamerktu estradíóli er rutt í burt, við jafnvægi, er notað til að lýsa einkennum prófunaríðefnisins sem efni sem binst, binst ekki eða gefur tvíræða svörun.

VERKFERLI

Sýnt fram á ásættanlegt nothæfi hrERα-prótíns

9. Áður en mettunarbindingagreiningar og samkeppnisháðar bindingagreiningar eru framkvæmdar venjubundið skal sýna fram á að nothæfi hverrar nýrrar lotu af hrERα sé með réttum hætti í rannsóknarstofunni þar sem hún verður notuð. Nota skal tveggja þrepa ferli til að sýna fram á nothæfi. Þessi þrep eru eftirfarandi:

— Gera skal [3H]-17β-estradíól-mettunarbindingagreiningu til að sýna fram á sértæki og mettun hrERα. Ólínuleg aðhvarfsgreining á þessum gögnum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og þar á eftir Scatchard-línurit ætti að sýna hrERα-bindingasækni [3H]-17β-estradíóls (Kd) og fjölda viðtaka (Bmax) fyrir hverja lotu af hrERα.

— Gera skal samkeppnisháða bindingagreiningu með því að nota samanburðarefnin (viðmiðunarestrógen (17β-estradíól)), efni sem binst veikt (t.d. noretýnódrel eða noretíndrón) og efni sem binst ekki (oktýltríetóoxýsílan (OTES)). Hver rannsóknarstofa skal koma á fót vísindasögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni IC_{50} og annarra gilda sem skipta máli fyrir viðmiðunarestrógenið og efni sem bindast veikt í mismunandi tilraunum og mismunandi lotum hrERα. Mæliþættirnir fyrir ferla samkeppnisháðrar bindingar fyrir samanburðarefnin skulu vera innan markanna fyrir 95% öryggisbilið (sjá töflu 1) sem voru þróuð með notkun gagna frá rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni fyrir þessa greiningu (2. heimild).

Tafla 1

Nothæfisviðmiðanir sem voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt, FW-hrER-bindingagreining

Efni	Mæliþáttur	Meðaltal (a)	Staðalfrávik (n)	95% öryggisbil (b)	
				Neðri mörk	Efri mörk
17β-estradíól	Toppur (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Botn (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-hallagildi	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 (c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretýnódrel	Toppur (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Botn (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-hallagildi	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	$LogIC_{50}$ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretíndrón (c)	Toppur (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Botn (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-hallagildi	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

a) Meðaltal (n) ± staðalfrávik (SD) voru reiknuð út með því að nota áætlaðar ferilaðlögunarbreytur (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í fjórum rannsóknarstofum meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá N-viðauka í 2. heimild).

b) Gefið er 95% öryggisbil sem leiðbeiningar vegna viðmiðana fyrir ásættanleika.

c) Prófun á noretíndróni var valkvæð sem undirverkefni 4 meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá 2. heimild, sjá undirverkefni 4). Þess vegna var meðaltalið ± SD (n) reiknað út með því að nota áætlaða ferilaðlögun (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í tveimur rannsóknarstofum.Styrkbilið fyrir IC_{50} verður háð Kd fyrir viðtakaefnablönduna og styrk geislamerkta bindilsins sem er notaður innan hverrar rannsóknarstofu. Viðeigandi aðlögun á styrkbili IC_{50}, byggt á þeim skilyrðum sem eru notuð til að framkvæma greininguna, er ásættanleg.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu

10. Sjá 17. og 18. lið og töflu 2 í „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ í þessari prófunaraðferð. Hver greining (mettunarbinding og samkeppnisháð binding) skal samanstanda af þremur sjálfstæðum keyrslum (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefnum) á mismunandi dögum og hver keyrsla skal innihalda þrjár samhliða prófanir.

Ákvörðun á styrk viðtaka (hrER*α*)

11. Styrkleiki virks viðtaka er eilítið breytilegur eftir lotu og geymsluskilyrðum. Af þessum sökum skal ákvarða styrkleika virks viðtaka sem er móttekinn frá birgi. Þá fæst viðeigandi styrkleiki virka viðtakans þegar keyrslan er framkvæmd.

12. Nafnstyrkur sem nemur 0,25, 0,5, 0,75 og 1 nM af viðtaka skal látinn standa án (samanlögð binding) og með (ósértæk binding) 1 µM af ómerktu estradíóli við skilyrði sem samsvara samkeppnisháðri bindingu (þ.e. 1 nM [3H]-estradíól). Sértæk binding, reiknuð út sem mismunurinn á samanlagðri bindingu og ósértækri bindingu, er teiknuð upp á móti nafnstyrk viðtakans. Styrkur viðtaka, sem gefur sértæk bindingagildi sem svara til 20% af viðbættum geislamerktum bindli, tengist samsvarandi nafnstyrk viðtakans og þessi styrkur viðtakans skal notaður í mettunarbindingatilraunum og samkeppnisháðum bindingatilraunum. Lokastyrkur sem nemur 0,5 nM fyrir hrER uppfyllir oft þetta skilyrði.

13. Ef það kemur ítrekað fyrir að ekki er hægt að uppfylla 20% viðmiðunina skal kanna fyrirkomulag tilraunarinnar m.t.t. hugsanlegrar skekkju. Ef 20% viðmiðunin næst ekki getur það bent til þess að mjög lítið sé af virkum viðtaka í raðbrigðalotunni og þá skal íhuga að nota aðra viðtakalotu.

Mettunargreining

14. Átta stighækkandi styrkleikar af [3H]17β-estradíóli skulu metnir í þremur settum samkvæmt eftirfarandi þrenns konar skilyrðum (sjá töflu 2):

— Án ómerkts 17β-estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Þetta er ákvörðun á samanlagðri bindingu með því að mæla geislavirkni í holum sem innihalda einungis [3H]17β-estradíól.

— Með styrkleika af ómerktu 17β-estradíóli sem er 1000-falt yfir styrkleika merkts 17β-estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Tilgangurinn með þessu skilyrði er að metta virku bindistaðina með ómerktu 17β-estradíóli og ákvarða ósértæku bindinguna með því að mæla geislavirknina í holunum. Litið er svo á að allt heitt (geislavirkt) estradíól sem eftir er, sem getur bundist viðtakanum, sé bundið á ósértækum stað þar eð kalt (ógeislavirkt) estradíól ætti að vera af það miklum styrk að það binst við alla tiltæka sértæka staði á viðtakanum.

— Án ómerkts 17β-estradíóls og án estrógenviðtaka (ER) (ákvörðun á heildargeislavirkni).

Tilreiðsla á lausnum með [3H]-17β-estradíóli og ómerktu 17β-estradíóli

15. Þynningar 17β-estradíóls skulu tilreiddar með því að bæta greiningarjafnalausn við 12 nM stofnlausn af [3H]-17β-estradíóli til að fá styrk sem er upphaflega á bilinu frá 0,12nM til 12 nM. Með því að bæta 40 µl af þessum lausnum við tilsvarandi greiningarholur í 96-hola míkrótítrunarbakka (endanlegt rúmmál nemur 160 µl), næst lokagreiningarstyrkleiki á bilinu frá 0,03 til 3,0 nM. Tilreiðslu greiningarjafnalausnar, [3H]-17β-estradíólstofnlausnar og þynninga og ákvörðun á styrkleikum er lýst ítarlega í FW-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

16. Þynningar etanól-17β-estradíóllausna skulu tilreiddar með því að bæta við greiningarjafnalausnum til að fá fram átta stighækkandi styrkleika sem eru upphaflega á bilinu frá 0,06 µM til 6 µM. Með því að bæta 80 µl af þessum lausnum við tilsvarandi greiningarholur í 96-hola míkrótítrunarbakka (endanlegt rúmmál nemur 160 µl), næst lokagreiningarstyrkleiki á bilinu frá 0,03µM til 3µM. Lokastyrkur ómerkts 17β-estradíóls í einstökum, ósértækum bindingagreiningarholum skal vera 1000-falt hærri en styrkur merkts [3H]-17β-estradíóls. Tilreiðslu lausna með ómerktu 17β-estradíóli er lýst ítarlega í FW-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

17. Nota skal nafnstyrk viðtaka sem gefur sértæka bindingu sem nemur 20±5% (sjá 12.–13. lið). Lausnin með hrERα skal tilreidd rétt fyrir notkun.

18. Tilreiða skal 96-hola míkrótítrunarbakka eins og lýst er í töflu 2 með 3 samhliða prófanir á hvern styrkleika. Dæmi um styrkleika og rúmmálsskiptingu [3H]-17β-estradíóls, ómerkts 17β-estradíóls, jafnalausnar og viðtaka í bakkanum eru gefin í viðbæti 2.2.

Tafla 2

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir mettunarbindingagreiningu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [3H] E2 + ER			0,06 nM [3H] E2 + ER			0,08 nM [3H] E2 + ER			0,10 nM [3H] E2 + ER			Saman-lögð binding (leysir)
B	0,30 nM [3H] E2 + ER			0,60 nM [3H] E2 + ER			1,0 nM [3H] E2 + ER			3,0 nM [3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [3H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [3H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [3H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Ósértæk binding
E	0,30 nM [3H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [3H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [3H] E2 + ER+ 1,0 μM E2			3,0 nM [3H] E2 + ER +3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17β-estradíól
ER: estrógenviðtaki
E2: ómerkt 17β-estradíól

19. Míkrótítrunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við 2–8 °C í 16–20 klst. og settir á snúningsbúnað meðan viðstöðutíminn stendur yfir.

Mæling á [3H]-17β-estradíóli sem er bundið við hrERα

20. [3H]-17β-estradíól sem er bundið við hrERα skal aðskilið frá óbundnu [3H]-17β-estradíóli með því að bæta 80 μl af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, hrista míkrótítrunarbakkana í 10 mínútur og skilja í skilvindu í 10 mínútur við u.þ.b. 2 500 snún./mín. Til að lágmarka klofnun bundins [3H]-17β-estradíóls frá hrERα meðan þetta ferli stendur yfir er afar mikilvægt að jafnalausnum og greiningarholum sé haldið við hitastig á bilinu 2 til 8 °C og að hvert þrep sé unnið hratt. Hristari fyrir míkrótítrunarbakka er nauðsynlegur til að vinna bakkana á skilvirkan og skjótan hátt.

21. Því næst skal taka 50 μl af floti, sem inniheldur hrERα-bundið [3H]-17β-estradíól, með mikilli gætni til að komast hjá hvers konar mengun í holunum með snertingu við dextranhúðuðu viðarkolin (DCC), og setja það í annan míkrótítr-unarbakka.

22. Því næst skal bæta 200 μl af sindurvökva, sem getur umbreytt hreyfiorku kjarnalosunar í ljósorku, í hverja holu (A1 til B12 og D1 til E12). Holur G1 til H12 (tilgreint sem dpm (sundrun á mínútu) samtals) sýna raðþynningar af [3H]-17β-estradíóli (40 μl) sem á að setja beint í sindurvökvann í holunum í mælingarbakkanum, eins og tilgreint er í töflu 3, þ.e. þessar holur innihalda aðeins 200 μl af sindurvökva og viðeigandi þynningu [3H]-17β-estradíóls. Þessar mælingar sýna hversu miklu magni af [3H]-17β-estradíóli í dpm (sundrun á mínútu) var bætt í hvert par af holum fyrir samanlagða bindingu og ósértæka bindingu.

Tafla 3

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir mettunarbindingagreiningu, mæling á geislavirkni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [3H] E2 + ER			0,06 nM [3H] E2 + ER			0,08 nM [3H] E2 + ER			0,10 nM [3 H] E2 + ER			Saman-lögð binding (leysir)
B	0,30 nM [3H] E2 + ER			0,60 nM [3H] E2 + ER			1,0 nM [3H] E2 + ER			3,0 nM [3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [3H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [3H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [3H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Ósértæk binding
E	0,30 nM [3H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [3H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [3H] E2 + ER+ 1,0 μM E2			3,0 nM [3H] E2 + ER +3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2(dpm samtals)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Samtals dpm (*)
H	0,30 nM [3H] E2			0,60 nM [3H] E2			1,0 nM [3H] E2			3,0 nM [3H] E2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradíól
ER: estrógenviðtaki
E2: ómerkt 17β-estradíól
dpm: sundrun á mínútu
(*) Heitum (geislavirkum) raðþynningum af [3H]-merktu estradíóli er bætt hér beint í 200 μl af sindurvökva í holum G1–H12.

23. Mæling skal hefjast eftir a.m.k. 2 klst. bið og talningartíminn á hverja holu skal vera 40 mínútur. Nota skal sindurteljara fyrir míkrótítrunarbakka til að ákvarða dpm/holu með leiðréttingu fyrir snöggkælingu. Að öðrum kosti má mæla sýnin í hefðbundnum teljara ef sindurteljari fyrir míkrótítrunarbakka er ekki tiltækur. Við þessi skilyrði má íhuga að stytta talningartímann.

Samkeppnisháð bindingagreining

24. Í samkeppnisháðri bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17β- estradíóli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Nota skal þrjár samskeiða samhliða prófanir fyrir hvern styrk í hverri keyrslu. Þar að auki skal keyra þrjár ósamskeiða keyrslur fyrir hvert íðefni sem er prófað. Setja skal greininguna upp í einn eða fleiri 96-hola míkrótítrunarbakka.

Samanburðir

25. Í hverri tilraun skal vera samskeiða samanburður með leysi og samanburðir (þ.e. viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og efni sem binst ekki) þegar greiningin er gerð. Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC_{50}) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; ii. samanburð með leysi og ósértækri bindingu, a.m.k. þrjú sett af hvoru um sig. Verklagi varðandi tilreiðslu greiningarjafnalausna, samanburða, [3H]-17β-estradíóls, hrERα og prófunaríðefnalausna er lýst í 2. heimild (K-viðauki, sjá FW-aðferðarlýsinguna fyrir greininguna).

Samanburður með leysi:

26. Samanburður með leysi sýnir að leysirinn hefur ekki víxlverkun á prófunarkerfið og mælir einnig samanlagða bindingu (TB). Etanól er ákjósanlegur leysir. Að öðrum kosti má nota dímetýlsúlfoxíð (DMSO) ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur í etanóli. Styrkur etanóls eða dímetýlsúlfoxíðs, ef það er notað, í lokagreiningarholunum er 1,5% og má ekki fara yfir 2%.

Samanburður með jafnalausn:

27. Samanburður með jafnalausn (BC) skal hvorki innihalda leysi né prófunaríðefni en alla aðra þætti greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með jafnalausn eru bornar saman við samanburðinn með leysi til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið.

Efni sem binst sterkt (viðmiðunarestrógen)

28. Innræni bindillinn er 17β-estradíól (CAS-númer 50-28-2) og binst með mikilli sækni við α-undirgerð estrógenviðtakans (ER). Staðalferill, þar sem ómerkt 17β-estradíól er notað, skal útbúinn fyrir hverja samkeppnisháða hrERα-bindingagreiningu til að unnt sé að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma á sömu rannsóknarstofunni. Átta lausnir af ómerktu 17β-estradíóli skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 100 nM–10 pM (-7[logM] til -11[logM]) með eftirfarandi bili: (-7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Hæsti styrkur ómerkts 17β-estradíóls (1 μM) gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu. Þessi styrkur er merktur með merkingunni „NSB“ í töflu 4 þó að hann sé einnig hluti af staðalferlinum.

Efni sem binst veikt

29. Efni sem binst veikt (noretýnódrel (CAS-númer 68-23-5) eða noretíndrón CAS-númer 68-22-4)) skal haft með til að sýna fram á næmi hverrar tilraunar og til að gera það kleift að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma. Átta lausnir af efni sem binst veikt skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 3 nM til 30 μM (-8.5[logM] til -4.5[logM]) með eftirfarandi bili: -4.5[logM], -5[logM], -5.5[logM], -6[logM], -6.5[logM], -7[logM],-7.5[logM], -8.5[logM].

Efni sem binst ekki

30. Nota skal oktýltríetóoxýsílan (OTES, CAS-númer 2 943-75-1) sem neikvæðan samanburð (efni sem binst ekki). Það veitir tryggingu fyrir því að greiningin, eins og hún er keyrð, greini hvenær prófunaríðefnin bindast ekki við hrERα. Átta lausnir af efni sem binst ekki skulu tilreiddar í etanóli og styrkleikinn í greiningarholunum skal vera á bilinu frá 0,1nM til 1 000 μM (-10[logM] til -3[logM]) í stigmagnaðri lograukningu. Hægt er að nota dí-n-bútýlþalat (DBP) til samanburðar sem staðgönguefni sem binst ekki. Sýnt hefur verið fram á að hámarksleysni þess er -4[logM].

Styrkur hrERα

31. Nota skal það magn viðtaka sem gefur 20±5% sértæka bindingu 1 nM geislamerkts bindils (sjá 12.–13. lið í 2. viðbæti). Lausnin með hrERα skal tilreidd rétt fyrir notkun.

[3H]-17β-estradíól

32. Styrkur [3H]-17β-estradíóls í greiningarholunum skal vera 1,0 nM.

Prófunaríðefni

33. Fyrir það fyrsta er nauðsynlegt að framkvæma leysniprófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar aðferðarlýsing prófunar er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkurinn sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarrannsókn samanstendur af samanburði með leysi ásamt log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall (sjá einnig 35. lið). Prófunaríðefnið skal prófað með því að nota 8 styrkleikaferla með lograðri dreifingu eins og skilgreint er í skammtastærðaprófuninni á undan. Styrkleikar í annarri og þriðju tilraun skulu aðlagaðir eins og við á til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar.

34. Þynningar prófunaríðefnisins skulu tilreiddar í viðeigandi leysi (sjá 26. lið í 2. viðbæti). Ef hæsti styrkur prófunaríð-efnisins er ekki leysanlegur annaðhvort í etanóli eða í dímetýlsúlfoxíði og að bæta meiri leysi við myndi valda því að styrkur leysisins í endanlega tilraunaglasinu yrði hærri en leyfilegt gildi, er heimilt að minnka hæsta styrkinn niður í næsthæsta styrkinn. Í því tilviki má bæta viðbótarstyrk við lægsta gildi styrkleikaraðanna. Aðrir styrkleikar í röðunum skulu haldast óbreyttir.

35. Fylgjast skal vel með prófunaríðefnalausnum þegar þeim er bætt í greiningarholur þar sem prófunaríðefnið getur botnfallið þegar því er bætt í greiningarholu. Gögn fyrir allar holur sem innihalda botnfall skulu undanskilin ferilaðlöguninni og ástæðurnar fyrir útilokun gagnanna tilgreindar.

36. Ef upplýsingar liggja þegar fyrir úr öðrum heimildum sem gefa log(IC_{50}) fyrir prófunaríðefni er e.t.v. rétt að ákvarða rúmfræðilegt bil milli þynninganna (þ.e. 0,5 lograeiningar í kringum log(IC_{50}) sem búist er við). Endanleg niðurstaða ætti að endurspegla næga dreifingu styrkleikanna sitt hvoru megin við log(IC_{50}), þ.m.t. „toppur“ og „botn“, þannig að hægt sé að lýsa eiginleikum bindingarferilsins á fullnægjandi hátt.

Skipulagning greiningarbakka

37. Þegar merktir míkrótítrunarbakkar eru tilreiddir skal hafa í huga viðstöðu í sex settum, með kóða fyrir samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarestrógens, sem gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu (NSB), og samanburð með jafnalausn, og hafa í huga viðstöðu í þremur settum, með kóða fyrir hvern og einn af átta styrkleikum samanburðarefnisins sem binst ekki (oktýltríetoxýsílan), lægri styrkleikana 7 fyrir viðmiðunarestrógenið, skammtastærðarstyrkleikana 8 af efninu sem binst veikt og styrkleikana 8 af hverju prófunaríðefni (TC). Skýringarmynd af sýniskipulagi fyrir bakka með alla styrkleika í styrkferlunum fyrir viðmiðunarestrógen og samanburð er hér á eftir í töflu 4. Notaðir eru viðbótarmíkrótítrunarbakkar fyrir prófunaríðefnin og skulu innihalda bakkasamanburð, þ.e. 1) háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC_{50}) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; 2) samanburð með leysi og ósértækri bindingu, sex sett af hvoru um sig (tafla 5). Dæmi um vinnublað vegna skipulags fyrir míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða greiningu, þar sem notuð eru þrjú óþekkt prófunaríðefni, er að finna í viðbæti 2.3. Styrkleikarnir sem eru tilgreindir í töflum 4 og 5 eru lokastyrkleikarnir í greiningunni. Hámarksstyrkur fyrir E2 skal vera 1×10^{-7} M og fyrir efni sem binst veikt skal nota hæsta styrk sem er notaður fyrir efni sem binst veikt á bakka 1. Rannsóknarstofan verður að ákvarða IC_{50}-styrkinn, byggt á rannsóknarsögulegum gagnagrunni hennar um samanburði. Gert er ráð fyrir að þetta gildi verði svipað því gildi sem kom fram í fullgildingarrannsóknunum (sjá töflu 1).

Tafla 4

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, allir styrkleikar fyrir styrkferla viðmiðunarestrógens og samanburða (bakki 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (einungis leysir)			TB (einungis leysir)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Blanksýni (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	Blanksýni (fyrir heitt) (**)			Blanksýni (fyrir heitt) (**)			Samanburður með jafnalausn			Samanburður með jafnalausn		

Í þessu dæmi er noretýnódrel (NE) efnið sem binst veikt

(*) raunverulegt blanksýni, hola ekki notuð

(**) blanksýni ekki notað meðan viðstaða stendur yfir en notað til að staðfesta samanlagða viðbætta geislavirkni.

Tafla 5

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, allir styrkleikar fyrir styrkferla prófunaríðefna og bakkasamanburða

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (einungis leysir)			TB (einungis leysir)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC50)			NE (1×10-4,5)			E2 (IC50)			E2 (1×10-7)		

Í þessu dæmi er noretýnódrel (NE) efnið sem binst veikt

Lokið við samkeppnisháða bindingagreiningu

38. Eins og sýnt er í töflu 6 skal bæta í holurnar 80 µl af samanburði með leysi, samanburði með jafnalausn, viðmiðunarestrógeni, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki og prófunaríðefnum, sem eru tilreidd í greiningarjafnalausn. Síðan skal bæta 40 µl af 4 nM [3H]-17β-estradíóli í hverja holu. Eftir léttan snúning í 10 til 15 mínútur við 2–8 °C skal bæta við 40 µl af hrERα-lausn. Míkrótítrunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við 2–8 °C í 16–20 klst. og settir á snúningsbúnað meðan viðstöðutíminn stendur yfir.

Tafla 6

Magn greiningarþátta fyrir samkeppnisháða hrER-bindingagreiningu, míkrótítrunarbakkar

Rúmmál (µl)	Innihaldsefni
80	Ómerkt 17β-estradíól, noretýnódrel, oktýltríetóoxýsílan (OTES), prófunaríðefni, leysir eða jafnalausn
40	4 nM [3H]-17β-estradíóllausn
40	hrERα-lausn, styrkur eins og hann er ákvarðaður
160	***Heildarmagn í hverri greiningarholu***

39. Mælingin á [3H]-17β-estradíóli sem er bundið við hrERα, eftir aðskilnað[3H]-17β-estradíóls sem er bundið við hrERα frá óbundnu [3H]-17β-estradíóli með því að bæta 80 µl af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, skal síðan framkvæmd eins og lýst er í 20.–23. lið fyrir mettunarbindingagreininguna.

40. Holur H1-6 (auðkenndar sem blanksýni (heit) í töflu 4) sýna dpm (sundrun á mínútu) fyrir [3H]-merkt estradíól í 40 µl. Deiliskammturinn 40 µl skal síðan settur beint í sindurvökvann í holum H1-H6.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Mettunarbindingagreining

41. Ferill sértækrar bindingar ætti að ná jafnvægi í takt við notkun á stighækkandi styrkleika [3H]-17β-estradíóls sem bendir til mettunar hrERα með bindli.

42. Sértæk binding við 1 nM af [3H]-17β-estradíóli ætti að vera innan viðunandi bilsins 15–25% af meðaltali mældrar samanlagðrar geislavirkni sem bætt er við í öllum keyrslum. Tilfallandi lítils háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins og endurtaka mettunargreininguna.

43. Gögnin ættu að gefa af sér línulegt Scatchard-línurit.

44. Ósértæk binding skal ekki vera óhófleg. Gildi fyrir ósértæka bindingu skal alla jafna vera <35% af samanlagðri bindingu. Þó getur hlutfallið af og til farið yfir þessi mörk við mælingu á mjög lágu dpm (sundrun á mínútu) fyrir lægsta prófaða styrk geislamerkts 17β-estradíóls.

Samkeppnisháð bindingagreining

45. Stighækkandi styrkleikar ómerkts 17β-estradíóls skulu ryðja [3H]-17β-estradíólinu burtu frá viðtakanum á þann hátt að það samræmist samkeppnisháðri bindingu við einn stað.

46. IC_{50}-gildið fyrir viðmiðunarestrógenið (þ.e. 17β-estradíól) skal vera u.þ.b. jafnt og mólstyrkur [3H]-17β-estradíóls að viðbættu Kd sem er ákvarðað út frá mettunarbindingagreiningunni.

47. Samanlögð sértæk binding ætti ófrávíkjanlega að vera innan viðunandi bilsins 20 ± 5% þegar meðaltal mælds styrks samanlagðrar geislavirkni, sem var bætt við hverja holu, var 1 nM í öllum keyrslum. Tilfallandi lítils háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins.

48. Leysirinn skal ekki breyta næmi eða samanburðarnákvæmni greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með leysi (TB-holur) eru bornar saman við samanburðinn með jafnalausn til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið. Niðurstöður heildarbindingar (TB) og samanburðar með jafnalausn ættu að vera sambærilegar ef leysirinn hefur engin áhrif á greininguna.

49. Efnið sem binst ekki skal ekki ryðja meira en 25% af [3H]-17β-estradíólinu burtu frá hrERα þegar það er prófað upp að 10^{-3} M (oktýltríetóoxýsílan (OTES)) eða 10^{-4} M (dí-n-bútýlþalat (DBP)).

50. Nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og tvö efni sem bindast veikt (t.d. noretýnódrel, noretíndrón) með notkun gagna úr fullgildingarrannsókninni á FW-hrER-bindingagreiningunni (N-viðauki í 2. heimild). Gefið er 95% öryggisbil fyrir meðaltalið (n) +/- SD fyrir allar samanburðarkeyrslur í öllum rannsóknarstofum sem taka þátt í fullgildingarrannsókninni. Reiknuð voru út 95% öryggisbil fyrir ferilaðlögunarbreyturnar (þ.e. toppur, botn, Hill-hallagildi, logIC_{50}) fyrir viðmiðunarestrógenið og efnin sem bindast veikt og fyrir log_{10}RBA (hlutfallsleg bindisækni) efnanna sem bindast veikt í hlutfalli við viðmiðunarestrógenið og er gefið upp sem nothæfisviðmiðun fyrir jákvæðu samanburðina. Í töflu 1 eru gefin upp þau bil sem búist er við fyrir ferilaðlögunarbreyturnar sem hægt er að nota sem nothæfisviðmiðanir. Í reynd getur styrkbil IC_{50} verið eilítið breytilegt eftir Kd-gildi viðtökuefnablöndunnar og styrk bindilsins.

51. Engar nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir ferilaðlögunarbreytur fyrir prófunaríðefnin vegna þeirra margvíslegu mögulegu prófunaríðefna sem til eru og breytileika í mögulegri sækni og útkomu (t.d. fullur ferill, hlutferill (e. *partial curve*), engin ferilaðlögun). Þó skal nota sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunaríðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn (t.d. 90–100% binding) á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhliða prófunum á hverjum styrkleika prófunaríðefnisins sem og í ósamskeiða keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Samanburðir úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni skulu nálgast þær mælingar á frammistöðu sem greint er frá fyrir þessa FW-greiningu og vera í samræmi við rannsóknarsöguleg samanburðargögn frá hverri rannsóknarstofu fyrir sig.

GREINING GAGNA

Mettunarbindingagreining

52. Bæði samanlögð binding og ósértæk binding eru mældar. Sértæk binding stighækkandi styrkleika af [3H]-17β-estradíóli við jafnvægisaðstæður er reiknuð út frá þessum gildum með því að draga ósértæka bindingu frá samanlagðri bindingu. Línurit yfir sértæka bindingu á móti styrk [3H]-17β-estradíóls ætti að ná jafnvægi fyrir hámark sértækrar bindingar sem bendir til mettunar hrERα með [3H]-17β-estradíólinu. Að auki ætti greining á gögnunum að færa sönnur á bindingu [3H]-17β-estradíóls við einn bindistað með mikla sækni. Ósértæk binding, samanlögð binding og sértæk binding skal sýnd með ferli fyrir mettunarbindingu. Við frekari greiningu á þessum gögnum skal nota ólínulega aðhvarfsgreiningu (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og sýna endanleg gögn sem Scatchard-línurit.

53. Við greiningu gagna skal ákvarða Bmax og Kd eingöngu út frá gögnum um samanlagða bindingu, á þeim forsendum að ósértæk binding sé línuleg, nema færð séu rök fyrir því að nota aðra aðferð. Að auki skal nota harðgert aðhvarf (e. *robust regression*) til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Alltaf skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu (t.d. með aðferð Swillens 1995) við að ákvarða Bmax og Kd út frá gögnum um mettunarbindingu.

Samkeppnisháð bindingagreining

54. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17β-estradíólbinding á móti styrk (log10-einingar) keppinautarins. Styrkur prófunaríðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17β-estradíólbindingar er IC_{50}-gildið.

55. Ákvarða skal áætluð log(IC_{50})-gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Alla jafna skal skilja topp, botn, hallatölu og log(IC_{50}) eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagaðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Ekki skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingarferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt skal reiknuð út sem hundraðshlutfall af log(IC_{50}) fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við log(IC_{50}) fyrir 17β-estradíólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar í 45.–50. lið í þessum 2. viðbæti.

56. Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Mælt er með því að hver keyrsla fyrir prófunaríðefni fari fyrst í gegnum staðlaða greiningu gagna sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt (sjá 55. lið hér að framan). Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlögunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athuganir á styrkháðri lækkun á hundraðshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradíóls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhliða prófana fyrir hvern íðefnastyrkleika og samkvæmni í aðlögunarbreytum milli keyrslnanna þriggja góð vísbending um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti.

Túlkun gagna

57. Litið er svo á að prófunaríðefni bindist hrERα ef hægt er að aðlaga bindingarferilinn og neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50% (mynd 1), að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar.

58. Að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefni sé bindist ekki hrERα ef:

— hægt er að aðlaga bindingaferil og neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins er ofan við 75% eða

— ekki er hægt að aðlaga bindingaferil og lægsta óaðlagaða meðaltal hundraðshlutfallsbindingar í styrkleikahópunum í gögnunum er ofan við 75%.

59. Prófunaríðefni teljast tvíræð ef ekkert af ofangreindum skilyrðum er uppfyllt (t.d. neðsti punktur á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

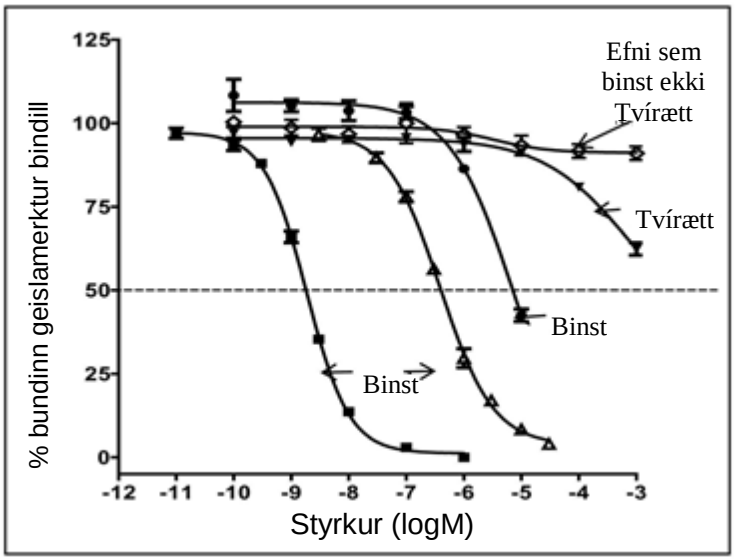
Tafla 7

Viðmiðanir fyrir flokkun á grundvelli ferils samkeppnisháðrar bindingar fyrir prófunaríðefni

Flokkun	Viðmiðanir
Binst[a]	Hægt er að aðlaga bindingaferil. Neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50%.
Binst ekki[b]	Ef hægt er að aðlaga bindingaferil, er neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins ofan við 75%. Ef ekki er hægt að aðlaga bindingaferil, er lægsta óaðlagaða meðaltal hundraðshlutfallsbindinga í styrkleikahópunum í gögnunum ofan við 75%.
Tvírætt[c]	Sérhver prófanleg keyrsla sem sýnir hvorki efni sem binst eða binst ekki (t.d. neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

Mynd 1

Dæmi um flokkun prófunaríðefnis með því að nota feril samkeppnisháðrar bindingar



60. Margar keyrslur fyrir prófunaríðefni, sem eru framkvæmdar innan rannsóknarstofu, eru settar saman með því að úthluta hverri keyrslu tölugildi og reikna út meðaltalið fyrir allar keyrslurnar eins og sýnt er í töflu 8. Niðurstöður úr samsettum keyrslum innan hverrar rannsóknarstofu eru bornar saman við þá flokkun sem búist var við fyrir hvert prófunaríðefni.

Tafla 8

Aðferð til að flokka prófunaríðefni með því að nota margar keyrslur innan rannsóknarstofu

Gildi úthlutað á hverja keyrslu:	
Flokkun	**Tölugildi**
Binst	2
Tvíræt	1
Binst ekki	0
Til að flokka meðaltal tölugilda í öllum keyrslum:	
Flokkun	**Tölugildi**
Binst	Meðaltal ≥ 1,5
Tvíræt	0,5 ≤ meðaltal < 1,5
Binst ekki	Meðaltal < 0,5

PRÓFUNARSKÝRSLA

61. Sjá 24. lið í „**ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ í þessari prófunaraðferð.

Viðbætir 2.1

SKRÁ YFIR HUGTÖK

[3H]E2: 17β-estradíól, geislamerkt með trítíumi

DCC: Dextranhúðuð viðarkol

E2: Ómerkt 17β-estradíól (óhvarfgjarnt)

Greiningarjafnalausn: 10 mM Tris, 10 mg nautgripasermisalbúmín/ml, 2 mM DTT, 10% glýseról, 0,2 mM levpeptín, pH-gildi 7.5

hrERα: Endurraðaður α-estrógenviðtaki úr mönnum

Samhliða prófun: Ein af mörgum holum, sem innihalda sama innihald í sömu styrkleikum, sem greining er gerð á samhliða greiningu innan einnar keyrslu. Í þessari aðferðarlýsingu er hver styrkleiki prófunaríðefnis prófaður í þremur settum; þ.e. gerð er greining á þremur samhliða prófunum samhliða með hverjum styrkleika prófunaríðefnis.

Keyrsla: Heilt sett af greiningarholum í míkrótítrunarbökkum, sem er keyrt samskeiða, sem veitir allar þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að lýsa einkennum bindingar prófunaríðefnis við hrERα (þ.e.a.s. heildarmagn [3H]-17β-estradíóls sem er bætt í greiningarholuna, hámarksbinding [3H]-17β-estradíóls við hrERα, ósértæk binding og samanlögð binding við mismunandi styrkleika prófunaríðefnisins). Keyrsla getur verið með allt niður í eina greiningarholu (þ.e. samhliða prófun) á hvern styrkleika en sökum þess að þessi aðferðarlýsing útheimtir greiningu í þremur settum samanstendur ein keyrsla af þremur greiningarholum á hvern styrkleika. Þar að auki útheimtir þessi aðferðarlýsing þrjár sjálfstæðar (þ.e. ósamskeiða) keyrslur á hvert íðefni.

Viðbætir 2.2

DÆMIGERÐ [^{3}H]-17B-ESTRADÍÓLMETTUNARGREINING MEÐ SAMHLIÐA PRÓFUN Í ÞREMUR HOLUM

Dæmigerð [3h]-17β-estradíólmettunargreining með samhliða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhliða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Dæmigerð [3h]-17β-estradíólmettunargreining með samhliða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhliða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Dæmigerð [3h]-17β-estradíólmettunargreining með samhliða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhliða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Heitt	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Heitt	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Heitt	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Heitt	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Heitt	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Dæmigerð [3h]-17β-estradíólmettunargreining með samhliða prófun í þremur holum

Staðsetning	Samhliða prófun	Kóði fyrir tegund holu	Heitt (geislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (nM)	Heitt (geislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Heitt (geislavirkt) E2 Lokastyrkur (nM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Upphafsstyrkur (µM)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Rúmmál (µl)	Kalt (ógeislavirkt) E2 Lokastyrkur (µM)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Rúmmál viðtaka (µl)	Heildarmagn í holum
H5	2	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Heitt	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Heitt	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Heitt	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 40 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

Viðbætir 2.3

SKIPULAG Á GREININGARHOLUM FYRIR SAMKEPPNISHÁÐA BINDINGAGREININGU

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A1	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	samanlögð binding	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	samanlögð binding	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	samanlögð binding	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	kalt E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	kalt E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	kalt E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	B10	1	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	kalt E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	kalt E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	kalt E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	kalt E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	blanksýni	blanksýni	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	blanksýni	blanksýni	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	blanksýni	blanksýni	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretýnódrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretýnódrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretýnódrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretýnódrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretýnódrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretýnódrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	D7	1	noretýnódrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretýnódrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretýnódrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretýnódrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretýnódrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretýnódrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretýnódrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretýnódrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretýnódrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E11	2	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretýnódrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	heitt	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	samanburður með jafnalausn	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 40 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	A1	1	samanlögð binding	TB	TBB1 B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	samanlögð binding	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	samanlögð binding	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	samanlögð binding	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Prófunaríðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Prófunaríðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Prófunaríðefni 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Prófunaríðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Prófunaríðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Prófunaríðefni 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Prófunaríðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Prófunaríðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Prófunaríðefni 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Prófunaríðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Prófunaríðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Prófunaríðefni 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	C1	1	Prófunaríðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Prófunaríðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Prófunaríðefni 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Prófunaríðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Prófunaríðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Prófunaríðefni 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Prófunaríðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Prófunaríðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Prófunaríðefni 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Prófunaríðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Prófunaríðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Prófunaríðefni 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Prófunaríðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Prófunaríðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Prófunaríðefni 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Prófunaríðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Prófunaríðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Prófunaríðefni 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Prófunaríðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Prófunaríðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Prófunaríðefni 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Prófunaríðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Prófunaríðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Prófunaríðefni 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	E1	1	Prófunaríðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Prófunaríðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Prófunaríðefni 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Prófunaríðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Prófunaríðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Prófunaríðefni 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Prófunaríðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Prófunaríðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Prófunaríðefni 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Prófunaríðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Prófunaríðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Prófunaríðefni 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Prófunaríðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Prófunaríðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Prófunaríðefni 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Prófunaríðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Prófunaríðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Prófunaríðefni 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Prófunaríðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Prófunaríðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Prófunaríðefni 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Prófunaríðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Prófunaríðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Prófunaríðefni 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Skipulag á greiningarholum fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu

Bakki	Staðsetning	Samhliða próftun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µL)	Rúmmál jafnalausnar (µL)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	G1	1	Prófunaríðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Prófunaríðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Prófunaríðefni 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Prófunaríðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Prófunaríðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Prófunaríðefni 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Prófunaríðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Prófunaríðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Prófunaríðefni 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Prófunaríðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Prófunaríðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Prófunaríðefni 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretýnódrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretýnódrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretýnódrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretýnódrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretýnódrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretýnódrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kalt E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kalt E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kalt E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kalt E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

3. viðbætir

GREINING CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) Í GLASI Á BINDINGU VIÐ ESTRÓGENVIÐTAKA MEÐ NOTKUN ENDURRAÐAÐS BINDILBINDISVÆÐISPRÓTÍNS ERα ÚR MÖNNUM

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

1. Í þessari greiningu *í glasi* á estrógenviðtaka- (ERα) mettun og samkeppnisháðri bindingu er notað bindisvæði bindils ERα úr mönnum (hrERα). Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan, framleiddi þessa prótínsmíð sem er samrunaprótín glútaþíón-S-transferasa (GST) og er tjáð í E. coli. CERI-aðferðarlýsingin fór í gegnum alþjóðlega fullgildingarrannsókn hjá mörgum rannsóknarstofum (2. heimild) sem sýndi fram á gildi hennar og áreiðanleika í fyrirhuguðum tilgangi greiningarinnar.

2. Þessi greining er kembirannsókn til að greina efni sem geta bundist við hrERα. Hún er notuð til að ákvarða getu prófunaríðefnis til að keppa við 17β-estradíól um bindingu við hrERα-bindisvæði bindils. Megindlegar greiningarniðurstöður geta náð yfir IC50 (mæling á styrk prófunaríðefnis sem þörf er á til að ryðja helmingnum af [3H]-17β-estradíólinu burtu frá hrERα) og hlutfallslega bindingasækni prófunaríðefna við hrERα samanborið við 17β-estradíól. Af ástæðum sem varða efnafræðilegar kembirannsóknir geta ásættanlegar eigindlegar niðurstöður úr greiningum náð yfir flokkun á prófunaríðefnum í efni sem bindast hrERα, bindast ekki eða binding er tvíræð, á grundvelli viðmiðana sem lýst er fyrir bindingarferlana.

3. Í greiningunni er notaður geislavirkur bindill sem útheimtir að rannsóknarstofan sé með leyfi fyrir geislavirkum efnum. Allt verklag í tengslum við geislavirkar samsætur og hættuleg íðefni skal fylgja reglugerðum og verklagsreglum eins og lýst er í landslöggjöf.

4. Lesa skal „**ALMENNUR INNGANGUR“ og „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ áður en þessi greining er notuð í eftirlitsskyni. Skilgreiningar og skammstafanir, sem notaðar eru í þessari viðmiðunarreglu um prófanir, koma fram í 1. viðbæti.

MEGINREGLUR GREININGARINNAR (SJÁ EINNIG „ALMENNUR INNGANGUR“)

5. Bindingagreiningin hrERα mælir getu geislamerkts bindils ([3H]17β-estradíól) til að bindast estrógenviðtaka (ER) við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis (þ.e. keppinautar um bindingu). Prófunaríðefni sem búa yfir mikilli sækni í estrógenviðtakann (ER) keppa við geislamerkta bindilinn við lægri styrk, samanborið við þau íðefni sem eru með minni sækni í viðtakann.

6. Þessi greining samanstendur af tveimur mikilvægum þáttum: mettunarbindingatilraun til að lýsa eiginleikum mæliþátta fyrir víxlverkun milli viðtaka og bindils og þar á eftir kemur samkeppnisháð bindingatilraun sem lýsir eiginleikum samkeppni milli prófunaríðefnis og geislamerkts bindils við bindingu við estrógenviðtakann (ER).

7. Tilgangurinn með mettunarbindingatilrauninni er að lýsa einkennum tiltekinnar lotu af viðtökum m.t.t. bindingasækni og fjölda til undirbúnings fyrir samkeppnisháðu bindingatilraunina. Í mettunarbindingatilrauninni eru mæld, við jafnvægisaðstæður, sækni estrógenviðtaka með föstum styrk í náttúrulegan bindil sinn (táknaður með klofnunarfasta (Kd)) og styrkur virkra viðtakasvæða (Bmax).

8. Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld sækni efnis til að keppa við [3H]17β-estradíól um bindingu við estrógenviðtakann (ER). Sæknin er magngreind með styrk prófunaríðefnis sem, í jafnvægi, heftir 50% af sértækri bindingu [3H]17β-estradíóls (kallað „heftistyrkur 50%“ eða IC_{50}). Þetta er einnig hægt að meta með því að nota hlutfallslega bindingasækni (RBA í hlutfalli við IC_{50} fyrir estradíól mælt aðskilið í sömu keyrslu). Í samkeppnisháðu bindingatilrauninni er mæld binding [3H]17β-estradíóls við fastan styrk með breiðu sviði (átta tugaþrep) prófunaríðefnisstyrkleika. Síðan eru gögnin aðlögðuð, ef unnt er, í samræmi við Hill-jöfnuna (Hill, 1910) sem lýsir því hvernig samkeppnisháður bindill, sem binst við einn stað, ryður geislamerkta bindlinum burtu. Umfang þess að geislamerktu estradíóli er rutt í burt, við jafnvægi, er notað til að lýsa einkennum prófunaríðefnisins sem efni sem binst, binst ekki eða gefur tvíræða svörun.

VERKFERLI

Sýnt fram á ásættanlegt nothæfi hrERα-prótíns

9. Áður en mettunarbindingagreiningar og samkeppnisháðar bindingagreiningar eru framkvæmdar venjubundið skal sýna fram á að nothæfi hverrar nýrrar lotu af hrERα sé með réttum hætti í rannsóknarstofunni þar sem hún verður notuð. Nota skal tveggja þrepa ferli til að sýna fram á nothæfi. Þessi þrep eru eftirfarandi:

— Gera skal [3H]-17β-estradíól-mettunarbindingagreiningu til að sýna fram á sértæki og mettun hrERα. Ólínuleg aðhvarfsgreining á þessum gögnum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og þar á eftir Scatchard-línurit ætti að sýna hrERα-bindingasækni [3H]-17β-estradíóls (Kd) og fjölda viðtaka (Bmax) fyrir tiltekna lotu af hrERα.

— Gera skal samkeppnisháða bindingagreiningu með því að nota samanburðarefnin (viðmiðunarestrógen (17β-estradíól)), efni sem binst veikt (t.d. noretýnódrel eða noretíndrón) og efni sem binst ekki (oktýltríetóoxýsílan (OTES)). Hver rannsóknarstofa skal koma á fót sögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni IC_{50} og gildi sem skipta máli fyrir viðmiðunarestrógenið og efni sem binst veikt í mismunandi tilraunum og mismunandi lotum hrERα. Þar að auki skulu mæliþættirnir fyrir ferla samkeppnisháðu bindingarinnar fyrir samanburðarefnin vera innan markanna fyrir 95% öryggisbilið (sjá töflu 1) sem voru þróuð með notkun gagna frá rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni fyrir þessa greiningu (2. heimild).

Tafla 1

Nothæfisviðmiðanir sem voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt, CERI-hrER-bindingagreining

Efni	Mæliþáttur	Meðaltal ([a])	Staðalfrávik ([a])	95% öryggisbil ([b])	
				Neðri mörk	Efri mörk
17β-estradíól	Toppur	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Botn	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-hallagildi	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretýnódrel	Toppur	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Botn	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-hallagildi	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretíndrón ([c])	Toppur	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Botn	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-hallagildi	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

([a]) Meðaltal ± staðalfrávik (SD) með sýnastærð (n) voru reiknuð út með því að nota áætlaða ferilaðlögun (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í fjórum rannsóknarstofum meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá N-viðauka í 2. heimild).

([b]) Gefið er 95% öryggisbil sem leiðbeiningar vegna viðmiðana fyrir ásættanleika.

([c]) Prófun á noretíndróni var valkvæð sem undirverkefni 4 meðan fullgildingarrannsóknin stóð yfir (sjá 2. heimild, sjá undirverkefni 4). Þess vegna var meðaltalið ± SD (n) reiknað út með því að nota áætlaða ferilaðlögun (Hill-jafna með 4 breytum) fyrir samanburðarkeyrslur sem voru gerðar í tveimur rannsóknarstofum.Styrkbilið fyrir IC_{50} verður háð Kd fyrir viðtakaefnablönduna og styrk geislamerkta bindilsins sem er notaður innan hverrar rannsóknarstofu. Viðeigandi aðlögun á styrkbili IC_{50}, byggt á þeim skilyrðum sem eru notuð til að framkvæma greininguna, er ásættanleg.

Sýnt fram á hæfni rannsóknarstofu

10. Sjá 17. og 18. lið og töflu 2 í „**ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR**“ í þessari prófunaraðferð. Hver greining (mettunarbinding og samkeppnisháð binding) skal samanstanda af þremur sjálfstæðum keyrslum (þ.e. með nýjum þynningum af viðtaka, íðefnum og prófefnum) á mismunandi dögum og hver keyrsla skal innihalda þrjár samhliða prófanir.

Ákvörðun á styrk viðtaka (hrERα)

11. Styrkleiki virks viðtaka er eilítið breytilegur eftir lotu og geymsluskilyrðum. Af þessum sökum skal ákvarða styrkleika virks viðtaka sem er móttekinn frá birgi. Þá fæst viðeigandi styrkleiki virka viðtakans þegar keyrslan er framkvæmd.

12. Nafnstyrkur sem nemur 0,1, 0,2, 0,4 og 0,6 nM af viðtaka skal látinn standa án (samanlögð binding) og með (ósértæk binding) 1 µM af ómerktu estradíóli við skilyrði sem samsvara samkeppnisháðri bindingu (þ.e. 0,5 nM [3H]-estradíól). Sértæk binding, reiknuð út sem mismunurinn á samanlagðri bindingu og ósértækri bindingu, er teiknuð upp á móti nafnstyrk viðtakans. Styrkur viðtaka sem gefur sértæk bindingagildi, sem svara til 40% af viðbættum geislamerktum bindli, tengist samsvarandi styrk viðtakans og þessi styrkur viðtakans skal notaður í mettunarbindingatilraunum og samkeppnisháðum bindingatilraunum. Lokastyrkur sem nemur 0,2 nM fyrir hrER uppfyllir oft þetta skilyrði.

13. Ef það kemur ítrekað fyrir að ekki er hægt að uppfylla 40% viðmiðunina skal kanna fyrirkomulag tilraunarinnar m.t.t. hugsanlegrar skekkju. Ef 40% viðmiðunin næst ekki getur það bent til þess að mjög lítið sé af virkum viðtaka í raðbrigðalotunni og þá skal íhuga að nota aðra viðtakalotu.

Mettunargreining

14. Átta stighækkandi styrkleikar af [3H]17β-estradíóli skulu metnir í þremur settum samkvæmt eftirfarandi þrenns konar skilyrðum (sjá töflu 2):

a. Án ómerkts 17β-estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Þetta er ákvörðun á samanlagðri bindingu með því að mæla geislavirkni í holum sem innihalda einungis [3H]17β-estradíól.

b. Með styrkleika af ómerktu 17β-estradíóli sem er 2000-falt yfir styrkleika merkts 17β-estradíóls og með estrógenviðtaka (ER). Tilgangurinn með þessu skilyrði er að metta virku bindistaðina með ómerktu 17β-estradíóli og ákvarða ósértæku bindinguna með því að mæla geislavirknina í holunum. Litið er svo á að allt heitt (geislavirkt) estradíól sem eftir er, sem getur bundist viðtakanum, sé bundið á ósértækum stað þar eð kalt (ógeislavirkt) estradíól ætti að vera af það miklum styrk að það binst við alla tiltæka sértæka staði á viðtakanum.

c. Án ómerkts 17β-estradíóls og án estrógenviðtaka (ER) (ákvörðun á heildargeislavirkni).

Tilreiðsla á [3H]-17β-estradíóli, ómerktum 17β-estradíóllausnum og hrERα

15. Tilreiða skal 40 nM lausn af [3H]-17β-estradíóli úr 1 µM stofnlausn af [3H]-17β-estradíóli í dímetýlsúlfoxíði með því að bæta við dímetýlsúlfoxíði (til að tilreiða 200 nM) og greiningarjafnalausn við stofuhita (til að tilreiða 40 nM). Með því að nota þessa 40 nM-lausn eru tilreiddar raðþynningar af [3H]-17β-estradíóli, á bilinu frá 0,313 nM til 40 nM, með greiningarjafnalausn við stofuhita (eins og sýnt er í 12. röð í töflu 2). Lokastyrkur greiningarinnar, á bilinu frá 0,313 til 4,0 nM, fæst með því að bæta 10 µl af þessum lausnum í viðeigandi greiningarholur í 96-hola míkrótítrunarbakka (sjá töflur 2 og 3). Tilreiðslu greiningarjafnalausnar, útreikningi á upphaflegri [3H]-17β-estradíólstofnlausn, byggt á eðlisvirkni hennar, tilreiðslu þynninga og ákvörðun á styrkleikum er lýst ítarlega í CERI-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

16. Þynningar af ómerktum 17β-estradíóllausnum skulu tilreiddar úr 1 nM 17β-estradíólstofnlausn með því að bæta við greiningarjafnalausnum til að fá fram átta stighækkandi styrkleika sem eru upphaflega á bilinu frá 0,625 µM til 80 µM. Lokastyrkur greiningarinnar, á bilinu frá 0,0625 til 8 µM, fæst með því að bæta 10 µl af þessum lausnum í viðeigandi greiningarholur í 96-hola míkrótítrunarbakka sem eru ætlaðar til að mæla ósértæka bindingu (sjá töflur 2 og 3). Tilreiðslu lausna með ómerktu 17β-estradíóli er lýst ítarlega í CERI-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

17. Nota skal styrk viðtaka sem gefur sértæka bindingu sem nemur 40±10% (sjá 12.–13. lið). Tilreiða skal hrERα-lausnina með ískaldri greiningarjafnalausn rétt fyrir notkun, þ.e. eftir að búið er að tilreiða allar holur fyrir samanlagða bindingu, ósértæka bindingu og fyrir heitan (geislavirkan) bindil einan og sér.

18. Tilreiða skal 96-hola míkrótítrunarbakka eins og lýst er í töflu 2 með 3 samhliða prófanir á hvern styrkleika [3H]-17β-estradíóls. Rúmmálsskipting [3H]-17β-estradíóls, ómerkts 17β-estradíóls, jafnalausnar og viðtaka er gefin í 3. viðbæti.

Tafla 2

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir mettunarbindingagreiningu

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Til að mæla TB			Til að mæla NSB			Til að ákvarða heitan (geislavirkan) bindil einan og sér				Ómerktar E2-þynningar fyrir bakkadálka 4–6	[3H]E2-þynningar fyrir bakkadálka 1–9
A	0,0313 nM [3H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [3H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [3H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [3H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [3H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [3H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [3H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB - samanlögð binding
NSB - ósértæk binding
[3H] E2 - [3H]17β-estradíól
E2 - ómerkt 17β-estradíól
(*) Uppgefnir styrkleikar hér eru lokastyrkleikar í hverri holu.
(**) Hægt er að tilreiða þynningar ómerkts E2 og [3H]E2 í öðrum bakka.

Tafla 3

Magn prófefnis fyrir mettun í míkrótítrunarbakka

Röð númer		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Tilreiðsluþrep		TB-holur			NSB-holur			Heitur (geislavirkur) bindill einn og sér		
Magn þátta fyrir ofangreindar hvarfholur og ísetningarröð	Jafnalausn	60 µl			50 µl			90 µl		
	ómerkt E2 úr 11. röð í töflu 2	—			10 µl			—		
	[3H]E2 úr 12. röð í töflu 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Heildarrúmmál hvarfblöndu		100 µl			100 µl			100 µl		
Viðstaða		**SVÖRUN EFTIR 2 KLST. VIÐSTÖÐU**						Mæling á geislavirkni rétt eftir tilreiðslu. Engin viðstaða		
Meðhöndlun með 0,4% dextranhúðuðum viðarkolum (DCC)		Já			Já			**Nei**		
Magn dextranhúðaðra viðarkola (DCC)		100 µl			100 µl			—		
Síun		Já			Já			Nei		
MÆLING Á DPM										
Magnákvörðun rúmmáls sem bætt er við sindurblönduna		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ef sindurtalning í vökva (LSC) fyrir örbakka er notuð til að mæla dpm (sundrun á mínútu) er ekki viðeigandi að tilreiða heitan (geislavirkan) bindil einan og sér í sama greiningarbakka og fyrir TB- og NSB-holur. Tilreiða skal heita (geislavirka) bindilinn einan og sér á öðrum bakka.

(**) Ef dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) eru aðskilin með skiljun skal mæla 50 µl af floti með sindurtalningu í vökva (LSC) til að komast hjá því að dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) mengist.

19. Míkrótítrunarbakkar fyrir greiningar til að ákvarða samanlagða bindingu og ósértæka bindingu skulu látnir standa við stofuhita (22–28 °C) í tvær klst.

Mæling á [^{3}H]-17β-estradíóli sem er bundið við hrERα

20. Eftir tveggja klst. viðstöðutíma skal [3H]-17β-estradíól, sem er bundið við hrERα, aðskilið frá óbundnu [3H]-17β-estradíóli með því að bæta 100µl af ískaldri 0,4% lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í holurnar. Síðan skal setja bakkana á ís í 10 mínútur og sía hvarfblönduna og lausn dextranhúðuðu viðarkolanna (DCC) með því að flytja þær yfir í míkrótítrunarbakkasíu til að fjarlægja dextranhúðuðu viðarkolin (DCC). Síðan skal bæta 100 µl af síuvökvanum við sindurvökvann í mælingaglösum fyrir sindurtalningu í vökva (LSC) til að ákvarða sundrun á mínútu (dpm) í hverju mælingaglasi með sindurtalningu í vökvanum.

21. Ef míkrótítrunarbakkasía er ekki tiltæk er að öðrum kosti hægt að fjarlægja dextranhúðuðu viðarkolin (DCC) með skiljun. Síðan skal taka 50 µl af floti sem inniheldur hrERα-bundið [3H]-17β-estradíól, með mikilli gætni til að komast hjá hvers konar mengun í holunum með snertingu við dextranhúðuðu viðarkolin (DCC), og nota það til sindurtalningar.

22. Heitur (geislavirkur) bindill einn og sér er notaður til að ákvarða sundrun [3H]-17β-estradíóls, sem er bætt í greiningarholurnar, á mínútu (dpm). Geislavirknin skal magngreind rétt eftir tilreiðslu. Þessar holur skulu ekki látnar standa og skulu ekki meðhöndlaðar með lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) heldur skal setja innihald þeirra beint í sindurvökvann. Þessar mælingar sýna hversu miklu magni af [3H]-17β-estradíóli í dpm (sundrun á mínútu) var bætt í hvert par af holum fyrir samanlagða bindingu og ósértæka bindingu.

Samkeppnisháð bindingagreining

23. Í samkeppnisháðri bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17β- estradíóli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Nota skal þrjár samskeiða samhliða prófanir fyrir hvern styrk í hverri keyrslu. Þar að auki skal keyra þrjár ósamskeiða keyrslur fyrir hvert íðefni sem er prófað. Setja skal greininguna upp í einn eða fleiri 96-hola míkrótítrunarbakka.

Samanburðir

24. Í hverri tilraun skal vera samskeiða samanburður með leysi og samanburðir (þ.e. viðmiðunarestrógen, efni sem binst veikt og efni sem binst ekki) þegar greiningin er gerð. Í einum bakka, við hverja keyrslu, skulu vera allir styrkleikar í styrkferlum viðmiðunarestrógensins og samanburðanna (þ.e. binst veikt og binst ekki). Allir aðrir bakkar skulu innihalda: i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá, þ.e. u.þ.b. öllum geislamerktum bindli rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC_{50}) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett af hvoru um sig; samanburð með leysi og ósértækri bindingu, þrjú sett af hvoru um sig. Verklagi við tilreiðslu greiningarjafnalausna, [3H]-17β-estradíóls, hrERα og prófunaríðefnalausna er lýst ítarlega í CERI-aðferðarlýsingunni (2. heimild).

Samanburður með leysi:

25. Samanburður með leysi sýnir að leysirinn hefur ekki víxlverkun á prófunarkerfið og mælir einnig heildarbindingu (TB). Dímetýlsúlfoxíð er ákjósanlegur leysir. Að öðrum kosti má nota etanól ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur í dímetýlsúlfoxíði. Styrkur dímetýlsúlfoxíðs í lokagreiningarholunum skal vera 2,05% og kann að aukast upp í 2,5% ef skortur er á leysni prófunaríðefnisins. Ekki skal nota dímetýlsúlfoxíð í styrk sem er yfir 2,5% þar sem hærri styrkur leysis truflar greininguna. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki leysanleg í dímetýlsúlfoxíði en eru leysanleg í etanóli má að hámarki nota 2% etanól í greiningunni án truflunar.

Samanburður með jafnalausn:

26. Samanburður með jafnalausn (BC) skal hvorki innihalda leysi né prófunaríðefni en alla aðra þætti greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með jafnalausn eru bornar saman við samanburðinn með leysi til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið.

Efni sem binst sterkt (viðmiðunarestrógen)

27. Innræni bindillinn er 17β-estradíól (CAS-númer 50-28-2) og binst með mikilli sækni við α-undirgerð estrógenviðtakans (ER). Staðalferill, þar sem ómerkt 17β-estradíól er notað, skal útbúinn fyrir hverja samkeppnisháða hrERα-bindingagreiningu til að unnt sé að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma á sömu rannsóknarstofunni. Tilreiða skal átta lausnir af ómerktu 17β-estradíóli í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum, sem á að nota fyrir staðalferilinn, með eftirfarandi bili: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Hæsti styrkur ómerkts 17β-estradíóls (1 μM) skal einnig gegna hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu. Þessi styrkur er merktur með merkingunni „NSB“ í töflu 4 þó að hann sé einnig hluti af staðalferlinum.

Efni sem binst veikt

28. Efni sem binst veikt (noretýnódrel (CAS-númer 68-23-5) eða, að öðrum kosti, noretíndrón (CAS-númer 68-22-4)) skal haft með til að sýna fram á næmi hverrar tilraunar og til að gera það kleift að meta breytileikann þegar greiningin er gerð yfir lengri tíma. Tilreiða skal átta lausnir af efninu sem binst veikt í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum sem hér segir: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} og 10^{-9} M.

Efni sem binst ekki

29. Nota skal oktýltríetóoxýsílan (OTES, CAS-númer 2 2943-75-1) sem neikvæðan samanburð (efni sem binst ekki). Það veitir tryggingu fyrir því að greiningin, eins og hún er keyrð, greini prófunaríðefni sem bindast ekki við hrERα. Tilreiða skal átta lausnir af efni sem binst ekki í dímetýlsúlfoxíði og greiningarjafnalausn með lokastyrk í greiningarholunum sem hér segir: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Hægt er að nota dí-n-bútýlþalat (DBP, CAS-númer 84-72-2) sem staðgönguefni sem binst ekki en það er einungis prófanlegt upp að 10^{-4}M. Sýnt hefur verið fram á að hámarksleysni dí-n-bútýlþalats (DBP) í greiningunni er 10^{-4}M.

Styrkur hrERα

30. Nota skal það magn viðtaka sem gefur 40±10% sértæka bindingu (sjá 12.–13. lið í 3. viðbæti). Tilreiða skal hrERα-lausnina með því að þynna virkt hrERα í ískaldri greiningarjafnalausn rétt fyrir notkun.

[^{3}H]-17β-estradíól

31. Lokastyrkur [3H]-17β-estradíóls í greiningarholunum skal vera 0,5 nM.

Prófunaríðefni

32. Fyrir það fyrsta er nauðsynlegt að framkvæma leysniprófun til að ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni og til að finna viðeigandi styrkbil til að nota þegar aðferðarlýsing prófunar er framkvæmd. Í upphafi skal ákvarða leysnimörk fyrir hvert prófunaríðefni í leysinum og síðan staðfesta þau frekar við greiningarskilyrði. Lokastyrkur sem er prófaður í greiningunni skal ekki fara yfir 1 mM. Skammtastærðarrannsókn felur í sér samanburð með leysi ásamt a.m.k. log 8 raðþynningum sem hefjast á leyfilegum hámarksstyrk (t.d. 1 mM eða lægri, byggt á leysnimörkunum) og veita skal því athygli hvort það sést grugg eða botnfall (sjá einnig 35. lið í 3. viðbæti). Þegar styrkbilið fyrir prófunina hefur verið ákvarðað skal prófa prófunaríðefni með því að nota 8 lograða styrkleika með hæfilegu bili eins og skilgreint er í undanfarandi skammtastærðarrannsókn. Styrkleikar sem eru prófaðir í annarri og þriðju tilraun skulu aðlagaðir enn frekar, eins og við á, til að lýsa betur eiginleikum ferils styrkháðrar svörunar, ef nauðsyn krefur.

33. Þynningar prófunaríðefnisins skulu tilreiddar í viðeigandi leysi (sjá 25. lið í 3. viðbæti). Ef hæsti styrkur prófunaríðefnisins er ekki leysanlegur annaðhvort í dímetýlsúlfoxíði eða í etanóli og að bæta meiri leysi við myndi valda því að styrkur leysisins í endanlega tilraunaglasinu yrði hærri en leyfilegt gildi, er heimilt að minnka hæsta styrkinn niður í næsthæsta styrkinn. Í því tilviki má bæta viðbótarstyrk við lægsta gildi styrkleikaraðanna. Aðrir styrkleikar í röðunum skulu haldast óbreyttir.

34. Fylgjast skal vel með prófunaríðefnalausnum þegar þeim er bætt í greiningarholur þar sem prófunaríðefnið getur botnfallið þegar því er bætt í greiningarholu. Gögn fyrir allar holur sem innihalda botnfall skulu undanskilin ferilaðlöguninni og ástæðurnar fyrir útilokun gagnanna tilgreindar.

35. Ef upplýsingar liggja þegar fyrir úr öðrum heimildum sem gefa log(IC_{50}) fyrir prófunaríðefni er e.t.v. rétt að ákvarða rúmfræðilegt bil milli þynninganna í kringum log(IC_{50}) sem búist er við (þ.e. 0,5 lograeiningar). Endanlegar niðurstöður ættu að sýna næga dreifingu styrkleikanna sitt hvoru megin við log(IC50), þ.m.t. „toppur“ og „botn“, þannig að hægt sé að lýsa eiginleikum bindingarferilsins á fullnægjandi hátt.

Skipulagning greiningarbakka

36. Tilreiða skal merkta míkrótítrunarbakka með notkun viðstöðu í sex settum fyrir samanburð með leysi, hæsta styrk viðmiðunarestrógens (E2), sem gegnir einnig hlutverki mælikvarða á ósértæka bindingu (NSB), samanburð með jafnalausn og viðstöðu í þremur settum fyrir hvern og einn af átta styrkleikum samanburðarefnisins sem binst ekki (oktýltríetoxýsílan), lægri styrkleikana 7 fyrir viðmiðunarestrógenið (E2), styrkleikana 8 af efninu sem binst veikt (noretýnódrel eða noretíndrón) og styrkleikana 8 af hverju prófunaríðefni (TC). Skýringarmynd af sýniskipulagi fyrir bakka með alla styrkleika í styrkferlunum fyrir viðmiðunarestrógen og samanburð er hér á eftir í töflu 4. Notaðir eru viðbótarmíkrótítrunarbakkar fyrir prófunaríðefni og skulu innihalda bakkasamanburð, þ.e. i. háan (hámark þess að efninu er rutt frá) og miðlungsháan (u.þ.b. IC_{50}) styrkleika af E2 og efni sem binst veikt, þrjú sett; ii. samanburð með leysi (sem heildarbinding og ósértæk binding, sex sett af hvoru um sig (tafla 5). Dæmi um vinnublað vegna skipulags fyrir míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða greiningu, þar sem notuð eru þrjú óþekkt prófunaríðefni, er að finna í viðbæti 3.3. Styrkleikar sem eru tilgreindir á vinnublaðinu sem og í töflum 4 og 5 eiga við um lokastyrk sem er notaður í hverri greiningarholu. Hámarksstyrkur fyrir E2 skal vera 1×10^{-7} M og fyrir efni sem binst veikt skal nota hæsta styrk sem er notaður fyrir efni sem binst veikt á bakka 1. Rannsóknarstofan verður að ákvarða IC_{50}-styrkinn, byggt á rannsóknarsögulegum gagnagrunni hennar um samanburði. Búist er við að þetta gildi verði svipað því gildi sem kom fram í fullgildingarrannsóknunum (sjá töflu 1).

Tafla 4

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, (1), (2) **allir styrkleikar fyrir styrkferla viðmiðunarestrógens og samanburða (bakki 1)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Samanburður með jafnalausn og jákvæður samanburður (E2)			Veikur jákvæður samanburður (noretýnódrel)			Neikvæður samanburður (oktýltríetóoxýsílan)			TB og NSB		
A	Blanksýni (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (samanburður með leysi) (2,05% dímetýlsúlfoxíð)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Samanburður með jafnalausn		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blanksýni (fyrir heitt) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Dæmi um uppsetningu fyrir staðlaðan míkrótítrunarbakka sem á að nota í hverri tilraun.

(2) Athygli er vakin á því að þessi míkrótítrunarbakki er útbúinn með því að nota þynningar sem eru gerðar í þynningarbakkanum sem lýst er fyrir staðlana í fyrri liðum.Í þessu dæmi er noretýnódrel (NE) efnið sem binst veikt

(*) raunverulegt blanksýni, hola ekki notuð

(**) blanksýni ekki notað meðan viðstaða stendur yfir en notað til að staðfesta samanlagða viðbætta geislavirkni.

Tafla 5

Skipulag míkrótítrunarbakka fyrir samkeppnisháða bindingagreiningu, viðbótarbakkar fyrir prófunaríðefni (TC) og bakkasamanburð

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Prófunaríðefni-1 (TC-1)			Prófunaríðefni-2 (TC-2)			Prófunaríðefni-3 (TC-3)			Samanburðir		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (samanburður með leysi)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Í þessu dæmi er noretýnódrel (NE) efnið sem binst veikt

Lokið við samkeppnisháða bindingagreiningu

37. Setja skal 50 µl af greiningarjafnalausn í hverja holu, þó ekki í holur fyrir samanlagða bindingu og blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar)) eins og sýnt er í töflu 6, og blanda hana með 10 µl af samanburði með leysi, viðmiðunarestrógeni, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki eða prófunaríðefnum, eftir því sem við á, og 10 µl af 5 nM [3H]-17β-estradíóllausn. Síðan er 30µl af ískaldri viðtakalausn bætt í hvern bakka og blandað varlega saman. Síðasta prófefnið sem skal bæta við er hrERα-lausnin. Míkrótítrunarbakkar fyrir greiningar skulu látnir standa við stofuhita (22–28 °C) í tvær klst.

Tafla 6

Magn greiningarþátta fyrir samkeppnisháða hrER-bindingagreiningu, míkrótítrunarbakkar

Tilreiðsluþrep		Annað en TB-holur	TB-holur	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))
Magn þátta fyrir ofangreindar hvarfholur og ísetningarröð	Greiningarjafnalausn við stofuhita	50 µl	60 µl	90 µl
	Ómerkt E2, efni sem binst veikt, efni sem binst ekki, leysir og prófunaríðefni (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-estradíól til að gefa lokastyrk sem nemur 0,5 nM (þ.e. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Ákvarðaður hrERα-styrkur (sjá 12.–13. lið)	30 µl	30 µl	—
Heildarmagn í hverri greiningarholu		100 µl	100 µl	100 µl

(*) tilreitt með réttum hætti til að fá lokastyrk innan ásættanlegs leysisstyrks

38. Mælingin á [3H]-17β-estradíóli sem er bundið við hrERα, eftir aðskilnað[3H]-17β-estradíóls sem er bundið við hrERα frá óbundnu [3H]-17β-estradíóli með því að bæta 100 µl af kaldri lausn dextranhúðaðra viðarkola (DCC) í hverja holu, skal síðan framkvæmd eins og lýst er í 21.–23. lið 3. viðauka fyrir mettunarbindingagreininguna.

39. Holur G10-12 og H10-12 (auðkenndar sem blanksýni (heit) í töflu 4) sýna dpm (sundrun á mínútu) fyrir [3H]-merkt estradíól í 10 µl. Deiliskammturinn 10 µl skal síðan settur beint í sindurvökvann.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Mettunarbindingagreining

40. Ferill sértækrar bindingar ætti að ná jafnvægi í takt við notkun á stighækkandi styrkleika [3H]-17β-estradíóls sem bendir til mettunar hrERα með bindli.

41. Sértæk binding við 0,5 nM af [3H]-17β-estradíóli ætti að vera innan viðunandi bilsins 30–50% af meðaltali mældrar samanlagðrar geislavirkni sem bætt er við í öllum keyrslum. Tilfallandi lítils háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins og endurtaka mettunargreininguna.

42. Gögnin ættu að gefa af sér línulegt Scatchard-línurit.

43. Ósértæk binding skal ekki vera óhófleg. Gildi fyrir ósértæka bindingu skal alla jafna vera <35% af samanlagðri bindingu. Þó getur hlutfallið af og til farið yfir þessi mörk við mælingu á mjög lágu dpm (sundrun á mínútu) fyrir lægsta prófaða styrk geislamerkts 17β-estradíóls.

Samkeppnisháð bindingagreining

44. Stighækkandi styrkleikar ómerkts 17β-estradíóls skulu ryðja [3H]-17β-estradíólinu burtu frá viðtakanum á þann hátt að það samræmist samkeppnisháðri bindingu við einn stað.

45. IC_{50}-gildið fyrir viðmiðunarestrógenið (þ.e. 17β-estradíól) skal vera u.þ.b. jafnt og mólstyrkur [3H]-17β-estradíóls að viðbættu Kd sem er ákvarðað út frá mettunarbindingagreiningunni.

46. Samanlögð sértæk binding ætti ófrávíkjanlega að vera innan viðunandi bilsins 40 ± 10 % þegar meðaltal mælds styrks samanlagðrar geislavirkni, sem var bætt við hverja holu, var 0,5 nM í öllum keyrslum. Tilfallandi lítils háttar frávik utan þessa bils eru viðunandi en ef keyrslur eru stöðugt utan þessa bils eða ef tiltekin keyrsla er marktækt utan við þetta bil skal aðlaga styrk prótínsins.

47. Leysirinn skal ekki breyta næmi eða samanburðarnákvæmni greiningarinnar. Niðurstöðurnar fyrir samanburðinn með leysi (TB-holur) eru bornar saman við samanburðinn með jafnalausn til að sannreyna að leysirinn, sem er notaður, hafi ekki áhrif á greiningarkerfið. Niðurstöður heildarbindingar (TB) og samanburðar með jafnalausn ættu að vera sambærilegar ef leysirinn hefur engin áhrif á greininguna.

48. Efnið sem binst ekki skal ekki ryðja meira en 25% af [3H]-17β-estradíólinu burtu frá hrERα þegar það er prófað upp að 10^{-3} M (oktýltríetóoxýsílan (OTES)) eða 10^{-4} M (dí-n-bútýlþalat (DBP)).

49. Nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir viðmiðunarestrógen og tvö efni sem bindast veikt (t.d. noretýnódrel, noretíndrón) með notkun gagna úr fullgildingarrannsókninni á CERI-hrER-bindingagreiningunni (N-viðauki í 2. heimild). Gefið er 95% öryggisbil fyrir meðaltalið ± SD (n) fyrir allar samanburðarkeyrslur í öllum fjórum rannsóknarstofum sem tóku þátt í fullgildingarrannsókninni. Reiknað var út 95% öryggisbil fyrir ferilaðlögunarbreyturnar (þ.e. toppur, botn, Hill-hallagildi og logIC_{50}) fyrir viðmiðunarestrógenið og efnin sem bindast veikt og $\log_{10}$RBA (hlutfallsleg bindisækni) af efnunum sem bindast veikt í hlutfalli við viðmiðunarestrógenið. Í töflu 1 eru gefin upp þau bil sem búist er við fyrir ferilaðlögunarbreyturnar sem hægt er að nota sem nothæfisviðmiðanir. Í reynd getur styrkbil IC_{50} verið eilítið breytilegt eftir Kd-gildi viðtökuefnablöndunnar, sem er leitt út í tilraunum, og styrk bindilsins sem er notaður í greiningunni.

50. Engar nothæfisviðmiðanir voru þróaðar fyrir ferilaðlögunarbreytur fyrir prófunaríðefnin vegna þeirra margvíslegu mögulegu prófunaríðefna sem til eru og breytileika í mögulegri sækni og útkomu (t.d. fullur ferill, hlutferill, engin ferilaðlögun). Þó skal nota sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni. Nota skal fullnægjandi styrkbil prófunaríðefnisins til að skilgreina á skýran hátt toppinn (t.d. 90–100% binding) á ferli samkeppnisháðrar bindingar. Breytileiki í samhliða prófunum á hverjum styrkleika prófunaríðefnisins sem og í ósamskeiða keyrslunum þremur skal vera hæfilegur og vísindalega forsvaranlegur. Samanburðir úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni skulu nálgast þær mælingar á frammistöðu sem greint er frá fyrir þessa CERI-greiningu og vera í samræmi við rannsóknarsöguleg samanburðargögn frá hverri rannsóknarstofu fyrir sig.

GREINING GAGNA

Mettunarbindingagreining

51. Bæði samanlögð binding og ósértæk binding eru mældar. Sértæk binding stighækkandi styrkleika af [3H]-17β-estradíóli við jafnvægisaðstæður er reiknuð út frá þessum gildum með því að draga ósértæka bindingu frá samanlagðri bindingu. Línurit yfir sértæka bindingu á móti styrk [3H]-17β-estradíóls ætti að ná jafnvægi fyrir hámark sértækrar bindingar sem bendir til mettunar hrERα með [3H]-17β-estradíólinu. Að auki ætti greining á gögnunum að færa sönnur á bindingu [3H]-17β-estradíóls við einn bindistað með mikla sækni. Ósértæk binding, samanlögð binding og sértæk binding skal sýnd með ferli fyrir mettunarbindingu. Við frekari greiningu á þessum gögnum skal nota ólínulega aðhvarfsgreiningu (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) og sýna endanleg gögn sem Scatchard-línurit.

52. Við greiningu gagna skal ákvarða Bmax og Kd eingöngu út frá gögnum um samanlagða bindingu, á þeim forsendum að ósértæk binding sé línuleg, nema færð séu rök fyrir því að nota aðra aðferð. Að auki skal nota harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Alltaf skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu (t.d. með aðferð Swillens 1995) við að ákvarða Bmax og Kd út frá gögnum um mettunarbindingu.

Samkeppnisháð bindingagreining

53. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17β-estradíólbinding á móti styrk (log10-einingar) keppinautarins. Styrkur prófunaríðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17β-estradíólbindingar er IC_{50}-gildið.

54. Ákvarða skal áætluð log(IC_{50})-gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Alla jafna skal skilja topp, botn, hallatölu og log(IC_{50}) eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagaðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Ekki skal leiðrétta fyrir bindlatæmingu. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingaferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hlutfallsleg bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt skal reiknuð út sem hundraðshlutfall af log(IC_{50}) fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við log(IC_{50}) fyrir 17β-estradíólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar í 44.-49. lið í þessum 3. viðbæti.

55. Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Mælt er með því að hver keyrsla fyrir prófunaríðefni fari fyrst í gegnum staðlaða gagnagreiningu sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt (sjá 54. lið í þessum 3. viðbæti). Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlögunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athuganir á styrkháðri lækkun á hundraðshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradíóls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhliða prófana fyrir hvern styrkleika prófunaríðefna og samkvæmni í aðlögunarbreytum milli keyrslnanna þriggja góð vísbending um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti.

Túlkun gagna

56. Litið er svo á að prófunaríðefni bindist hrERα ef hægt er að aðlaga bindingarferilinn og neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50% (mynd 1), að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar.

57. Að því tilskildu að allar viðmiðanirnar fyrir ásættanleika séu uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefni bindist ekki hrERα ef:

— hægt er að aðlaga bindingaferil og neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins er ofan við 75% eða

— ekki er hægt að aðlaga bindingaferil og lægsta óaðlagaða meðaltal hundraðshlutfallsbindingar í styrkleikahópunum í gögnunum er ofan við 75%.

58. Prófunaríðefni teljast tvíræð ef ekkert af ofangreindum skilyrðum er uppfyllt (t.d. neðsti punktur á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

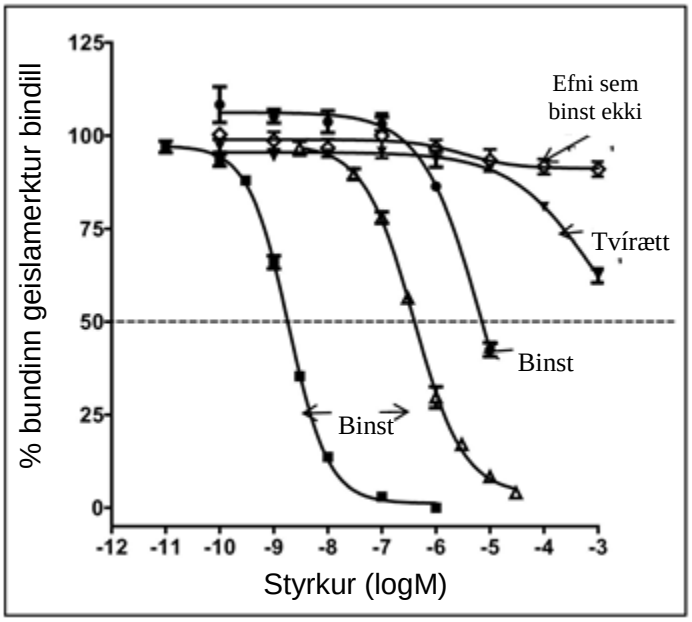
Tafla 7

Viðmiðanir fyrir flokkun á grundvelli ferils samkeppnisháðrar bindingar fyrir prófunaríðefni

Flokkun	Viðmiðanir
Binst[a]	Hægt er að aðlaga bindingaferil. Neðsti punkturinn á svörunarferlinum innan gagnasviðsins er minni en 50%.
Binst ekki[b]	Ef hægt er að aðlaga bindingaferil, er neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum innan gagnasviðsins ofan við 75%. Ef ekki er hægt að aðlaga bindingaferil, er lægsta óaðlagaða meðaltal hundraðshlutfallsbindinga í styrkleikahópunum í gögnunum ofan við 75%.
Tvírætt[c]	Sérhver prófanleg keyrsla sem sýnir hvorki efni sem binst eða binst ekki (t.d. neðsti punkturinn á aðlagaða svörunarferlinum er á bilinu 76–51%).

Mynd 1

Dæmi um flokkun prófunaríðefnis með því að nota feril samkeppnisháðrar bindingar



59. Margar keyrslur fyrir prófunaríðefni, sem eru framkvæmdar innan rannsóknarstofu, eru settar saman með því að úthluta hverri keyrslu tölugildi og reikna út meðaltalið fyrir allar keyrslurnar eins og sýnt er í töflu 8. Niðurstöður úr samsettum keyrslum innan hverrar rannsóknarstofu eru bornar saman við þá flokkun sem búist var við fyrir hvert prófunaríðefni.

Tafla 8

Aðferð til að flokka prófunaríðefni með því að nota margar keyrslur innan rannsóknarstofu

Gildi úthlutað á hverja keyrslu:	
Flokkun	**Tölugildi**
Binst	2
Tvírætt	1
Binst ekki	0

Til að flokka meðaltal tölugilda í öllum keyrslum:

Flokkun	**Tölugildi**
Binst	Meðaltal ≥ 1,5
Tvírætt	0,5 ≤ meðaltal < 1,5
Binst ekki	Meðaltal < 0,5

PRÓFUNARSKÝRSLA

60. Sjá 24. lið í „ÞÆTTIR hrER-BINDINGAGREININGAR“ í þessari prófunaraðferð.

Viðbætir 3.1

SKRÁ YFIR HUGTÖK

[3H]E2: 17β-estradíól, geislamerkt með trítíumi

DCC: Dextranhúðuð viðarkol

E2: Ómerkt 17β-estradíól (óhvarfgjarnt)

Greiningarjafnalausn: 10 mM Tris-HCl, pH-gildi 7,4, inniheldur 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10% glýseról, 0,2 mM levpeptín, 1 mM díþíóþreitól og 10 mg/ml nautgripasermisalbúmín

hrERα: Endurraðaður α-estrógenviðtaki úr mönnum (bindisvæði bindils)

Samhliða prófun: Ein af mörgum holum, sem innihalda sama innihald í sömu styrkleikum, sem greining er gerð á samhliða greiningu innan einnar keyrslu. Í þessari aðferðarlýsingu er hver styrkleiki prófunaríðefnis prófaður í þremur settum; þ.e. gerð er greining á þremur samhliða prófunum samhliða með hverjum styrkleika prófunaríðefnis.

Keyrsla: Heilt sett af greiningarholum í míkrótítrunarbökkum, sem er keyrt samskeiða, sem veitir allar þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að lýsa einkennum bindingar prófunaríðefnis við hrERα (þ.e.a.s. heildarmagn [3H]-17β-estradíóls sem er bætt í greiningarholuna, hámarksbinding [3H]-17β-estradíóls við hrERα, ósértæk binding og samanlögð binding við mismunandi styrkleika prófunaríðefnisins). Keyrsla getur verið með allt niður í eina greiningarholu (þ.e. samhliða prófun) á hvern styrkleika en sökum þess að þessi aðferðarlýsing útheimtir greiningu í þremur settum samanstendur ein keyrsla af þremur greiningarholum á hvern styrkleika. Þar að auki útheimtir þessi aðferðarlýsing þrjár sjálfstæðar (þ.e. ósamskeiða) keyrslur á hvert íðefni.

Viðbætir 3.2

SKIPULAG Á GREININGARHOLUM FYRIR SAMKEPPNISHÁÐA BINDINGAGREININGU

Bakki	**Staðsetning**	**Samhliða prófun**	**Tegund holu**	**Kóði holu**	**Kóði styrkleika**	**Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)**	**Stofn hrER (µl)**	**Rúmmál jafnalausnar (µl)**	**Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)**	**Rúmmál úr þynningarbakka (µL)**	**Endanlegt rúmmál (µl)**	**Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)**
S	A1	1	Blanksýni	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanksýni	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanksýni	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	kalt E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	kalt E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	D3	3	kalt E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	kalt E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	kalt E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	kalt E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	kalt E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A4	1	noretýnódrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretýnódrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretýnódrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretýnódrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretýnódrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretýnódrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretýnódrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretýnódrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretýnódrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretýnódrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretýnódrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretýnódrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretýnódrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E5	2	noretýnódrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretýnódrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretýnódrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretýnódrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretýnódrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretýnódrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretýnódrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretýnódrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretýnódrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretýnódrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretýnódrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	samanlögð binding	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	B11	5	samanlögð binding	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	samanlögð binding	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	kalt E2 (hátt)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	kalt E2 (hátt)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	kalt E2 (hátt)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Samanburður með jafnalausn	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Samanburður með jafnalausn	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Samanburður með jafnalausn	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Samanburður með jafnalausn	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Samanburður með jafnalausn	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Samanburður með jafnalausn	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H1	—	90	—	10	—	100	—

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
S	G11 (*)	2	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Blanksýni (fyrir heitar (geislavirkar))	Heitt	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Óþekkt 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Óþekkt 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Óþekkt 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	D1	1	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Óþekkt 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Óþekkt 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Óþekkt 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Óþekkt 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	H3	3	Óþekkt 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Óþekkt 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Óþekkt 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Óþekkt 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Óþekkt 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	E5	2	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Óþekkt 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Óþekkt 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Óþekkt 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Óþekkt 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Óþekkt 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	B7	1	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Óþekkt 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Óþekkt 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Óþekkt 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Óþekkt 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	F9	3	Óþekkt 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Óþekkt 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Óþekkt 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Samanburður E2 (hám.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Samanburður E2 (IC_{50})	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Samanburður E2 (IC_{50})	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Samanburður E2 (IC_{50})	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	C10	1	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Samanburður NE (hám.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Samanburður NE (IC_{50})	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Samanburður NE (IC_{50})	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Samanburður NE (IC_{50})	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	kalt E2 (hátt)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	kalt E2 (hátt)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	kalt E2 (hátt)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	kalt E2 (hátt)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	kalt E2 (hátt)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	kalt E2 (hátt)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Bakki	Staðsetning	Samhliða prófun	Tegund holu	Kóði holu	Kóði styrkleika	Upphafsstyrkur keppinautar um bindingu (M)	Stofn hrER (µl)	Rúmmál jafnalausnar (µl)	Sporefni (heitt (geislavirkt) E2) Rúmmál (µL)	Rúmmál úr þynningarbakka (µL)	Endanlegt rúmmál (µl)	Lokastyrkur keppinautar um bindingu (M)
P1	G10	1	samanlögð binding	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	samanlögð binding	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	samanlögð binding	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	samanlögð binding	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	samanlögð binding	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	samanlögð binding	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Athygli er vakin á því að „heitar“ (geislavirkar) holur eru tómar meðan viðstaðan stendur yfir. Rúmmálinu 10 µl er einungis bætt við vegna sindurtalningar.

4. viðbætir

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA VIÐ GREININGU GAGNA ÚR SAMKEPPNISHÁÐRI HRER-BINDINGAGREININGU

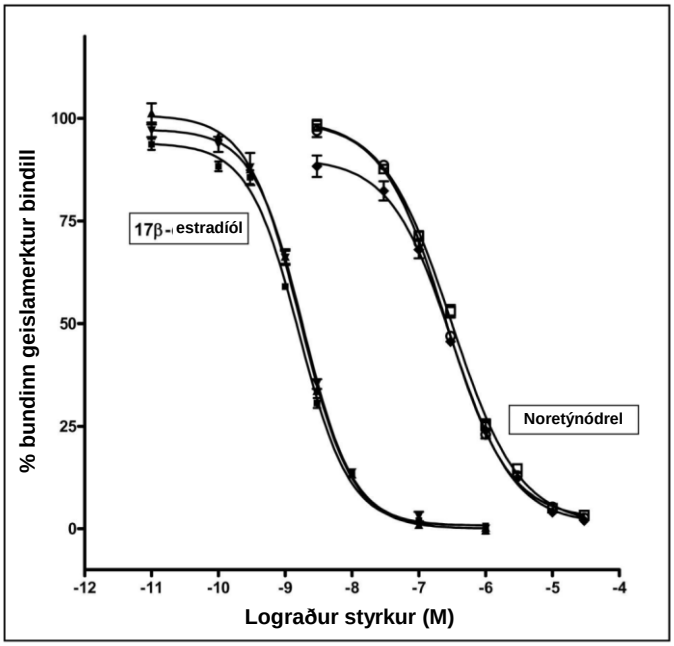
1. Í samkeppnisháðri hrERα-bindingagreiningu er binding eins styrkleika af [3H]-17β- estradíóli mæld við stighækkandi styrkleika prófunaríðefnis. Ferill samkeppnisháðrar bindingar er teiknaður upp sem sértæk [3H]-17β-estradíólbinding á móti styrk (log10-einingar) keppinautarins. Styrkur prófunaríðefnis sem heftir 50% af hámarki sértækrar [3H]-17β-estradíólbindingar er IC_{50}.

   Greining gagna um viðmiðunarestrógen og efni sem bindast veikt (1)

2. Gögnum úr samanburðarkeyrslunum er umbreytt (þ.e. hundraðshlutfall [3H]-17β-estradíólsértækrar bindingar og lograður styrkur samanburðaríðefnisins) fyrir frekari greiningar. Ákvarða skal áætluð log(IC_{50})-gildi fyrir jákvæða samanburði (t.d. viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt) með því að nota viðeigandi ólínulegan ferilaðlögunarhugbúnað til að aðlaga Hill-jöfnu með fjórum breytum (t.d. BioSoft; GraphPad Prism) (2. heimild). Alla jafna er hægt að skilja topp, botn, hallatölu og log(IC_{50}) eftir óþvinguð þegar þessir ferlar eru aðlagaðir. Nota skal harðgert aðhvarf til að ákvarða bestu mátgæði nema færð séu rök fyrir öðru. Tilgreina skal valda aðferð við harðgert aðhvarf. Ekki var þörf á leiðréttingu fyrir bindlatæmingu fyrir FW- eða CERI-hrER-greiningarnar en ef þörf krefur má íhuga það. Eftir upphaflega greiningu skal yfirfara hvern bindingaferil til að tryggja að hann falli á viðeigandi hátt að líkaninu. Hægt er að reikna út hlutfallslega bindingasækni (RBA) fyrir efnið sem binst veikt sem hundraðshlutfall af log(IC_{50}) fyrir efnið sem binst veikt í hlutfalli við log(IC_{50}) fyrir 17β-estradíólið. Niðurstöður úr jákvæðum samanburðum og samanburði með efni sem binst ekki skulu metnar með því að nota mælikvarðana á nothæfi greiningarinnar og viðmiðanirnar fyrir ásættanleika sem lýst er í þessari prófunaraðferð (20. liður), 2. viðbæti (FW-greining, 41.–51. liður) og 2. viðbæti (CERI-greining, 41.–51. liður). Dæmi um 3 keyrslur fyrir viðmiðunarestrógen og efni sem binst veikt eru sýnd á mynd 1.

Mynd 1

Dæmi um ferla samkeppnisháðrar bindingar fyrir viðmiðunarestrógenið og samanburðarefni sem binst veikt



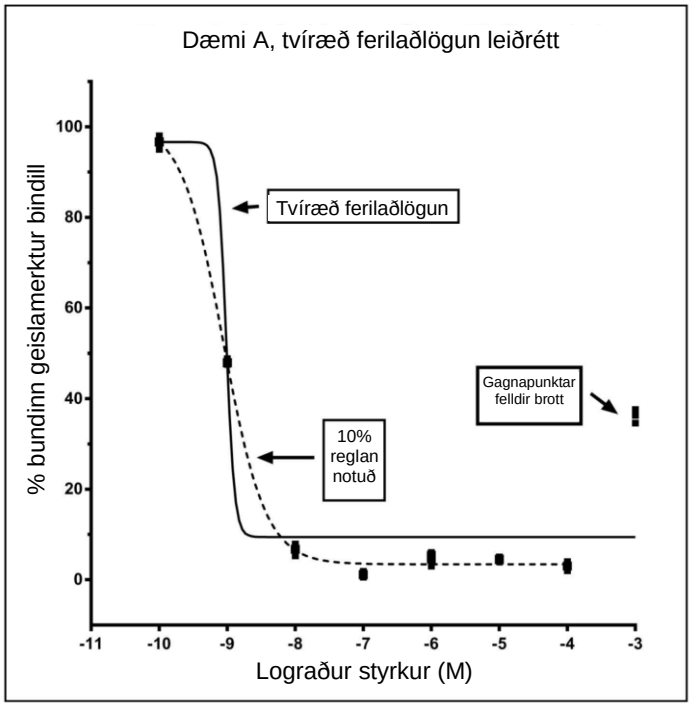
Greining gagna um prófunaríðefni

3. Gögn fyrir öll prófunaríðefni skulu greind með því að nota þrepskipta nálgun til að tryggja að gögnin séu greind með viðeigandi hætti og að hver ferill samkeppnisháðrar bindingar sé flokkaður á tilhlýðilegan hátt. Hver keyrsla fyrir prófunaríðefni skal fyrst fara í gegnum staðlaða gagnagreiningu sem er nákvæmlega eins og sú sem er notuð fyrir viðmiðunarestrógen og samanburðarefni sem bindast veikt. Þegar því er lokið skal gera tæknilega endurskoðun á ferilaðlögunarbreytunum og einnig gera sjónræna skoðun á því hversu vel gögnin falla að fengnum ferli samkeppnisháðrar bindingar fyrir hverja keyrslu. Meðan þessi tæknilega endurskoðun stendur yfir eru athuganir á styrkháðri lækkun á hundraðshlutfalli sértækt bundins [3H]-17β-estradíóls, lítill breytileiki milli tæknilegra samhliða prófana fyrir hvern íðefnastyrkleika og samkvæmni í aðlögunarbreytum milli keyrslnanna þriggja góð vísbending um að greiningin og gagnagreiningin hafi verið framkvæmd með viðeigandi hætti. Nota skal sérfræðiálit þegar farið er yfir niðurstöður úr hverri keyrslu fyrir prófunaríðefni og gögnin sem eru notuð til að flokka hvert prófunaríðefni sem efni sem binst eða binst ekki skulu vera vísindalega forsvaranleg.

4. Af og til geta komið fram gögn sem þarf að gefa meiri gaum til að greina og túlka gögnin um hrER-bindingu á viðeigandi hátt. Fyrri rannsóknir hafa leitt í ljós tilvik þar sem greining og túlkun gagna um samkeppnisháða viðtakabindingu geta orðið flóknari vegna hækkunar á hundraðshlutfalli sértækrar bindingar þegar íðefni eru prófuð við hæsta styrk (mynd 2). Þetta er vel þekkt atriði sem komið hefur upp við notkun á aðferðalýsingum fyrir nokkrar samkeppnishæfar greiningar á bindingu við viðtaka (3. heimild). Í þessum tilvikum kemur styrkháð svörun fram við lægri styrkleika en þegar styrkur prófunaríðefnisins nálgast leysnimörkin dregur ekki lengur úr því að [3H]17β-estradíólinu sé rutt frá. Í þessum tilvikum benda gögn um meiri styrk til þess að líffræðilegum mörkum greiningarinnar hafi verið náð. Þetta fyrirbæri er t.d. oft tengt óleysanleika íðefnis og botnfalli við háan styrk eða getur einnig endurspeglað að farið hafi verið yfir getu dextranhúðuðu viðarkolanna til að fanga óbundna geislamerkta bindilinn í aðskilnaðarferlinu við hæstu íðefnastyrkleikana. Ef slíkir gagnapunktar eru skildir eftir þegar gögn samkeppnisháðrar bindingar eru aðlöguð að sigmoid-ferli getur það stundum leitt til þess að ER-bindingarmáttur prófunaríðefnis sé ranglega flokkaður (mynd 2). Til að komast hjá þessu innihalda aðferðarlýsingar fyrir FW- og CERI-hrER-bindingagreiningarnar möguleikann á því að undanskilja gagnapunkta úr greiningunum ef meðaltal samhliða prófana fyrir hundraðshlutfall sértækrar [3H]17β-estradíólbindingar er 10% eða meira yfir meðaltalinu sem kom fram við lægri styrk (þ.e. þetta er yfirleitt kallað 10% reglan). Þessa reglu er einungis hægt að nota einu sinni fyrir tiltekinn feril og það verða að standa eftir gögn fyrir a.m.k. 6 styrkleika þannig að hægt sé að flokka ferilinn með réttum hætti.

Mynd 2

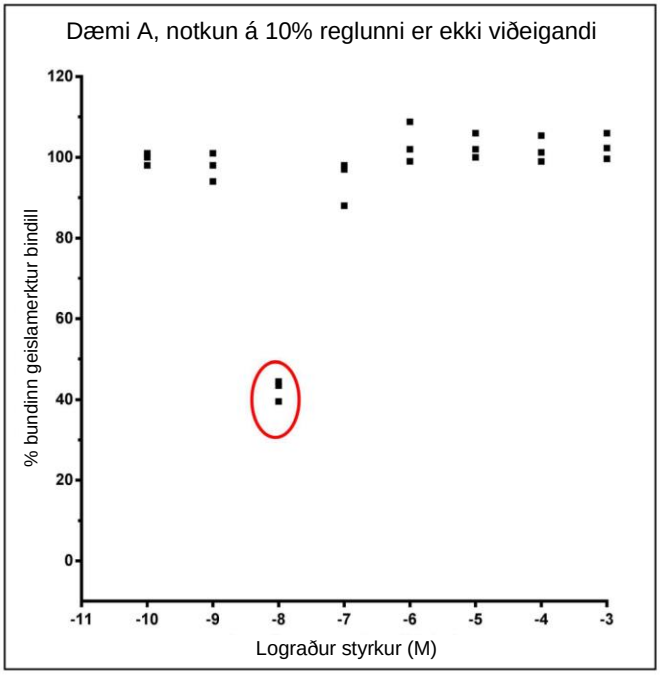
Dæmi um ferla samkeppnisháðrar bindingar með og án notkunar á 10% reglunni

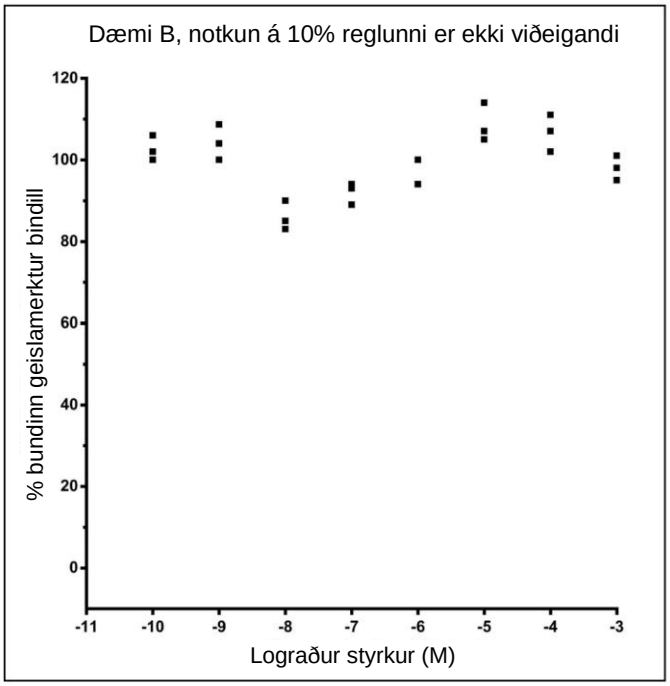


5. Viðeigandi notkun á 10% reglunni til að leiðrétta þessa ferla skal gaumgæfð vandlega og einungis notuð í tilvikum þar sem sterkar vísbendingar eru um efni sem binst hrER. Meðan tilraunir vegna fullgildingarrannsóknar á FW-hrER-bindingagreiningunni stóðu yfir kom í ljós að 10% reglan hafði stundum ótilætlaðar og ófyrirséðar afleiðingar. Íðefni sem höfðu enga víxlverkun á viðtakann (þ.e. eiginleg efni sem bindast ekki) sýndu oft breytileika ef binding geislamerkts bindils var 100% sem var meiri en 10% í öllum styrkbilum sem voru prófuð. Ef svo vildi til að lægsta gildið væri við lágan styrk væri mögulega hægt að fella gögn um alla hærri styrkleika brott úr greiningunni með því að nota 10% regluna, jafnvel þó að þessir styrkleikar gætu komið að gagni við að ákvarða hvort íðefnið sé efni sem binst ekki. Í mynd 3 eru dæmi um tilvik þar sem notkun á 10% reglunni er ekki viðeigandi.

Mynd 3

Dæmi, gögn um samkeppnisbindingu þar sem notkun á 10% reglunni er ekki viðeigandi.





Tilvísanir

1) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, bls. 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. Toxicological Sci. 94(1):46-56.“

B.71 GREININGAR Í GLASI Á HÚÐNÆMINGU ÞAR SEM FENGIST ER VIÐ LYKILATBURÐINN VIRKJUN ANGAFRUMA Í FERLI NEIKVÆÐRA AFLEIÐINGA (AOP) M.T.T. HÚÐNÆMINGAR*IN VITRO* SKIN SENSITISATION ASSAYS ADDRESSING THE KEY EVENT ON ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS ON THE ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FOR SKIN SENSITISATION

ALMENNUR INNGANGUR

Prófunaraðferð sem byggir á lykilatburðinum virkjun angafruma

1. 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 Evrópusambandsins (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun)([1]). Almennt samkomulag er um helstu líffræðilegu atburði sem liggja að baki húðnæmingu. Núverandi þekking á efnafræðilegu og líffræðilegu gangvirki sem tengist húðnæmingu hefur verið tekin saman sem ferli neikvæðra afleiðinga samkvæmt áætlun Efnahags- og framfarastofnunarinnar um ferli neikvæðra afleiðinga (AOP programme) (2. heimild) og hefst á sameindaræsingunni, um milliatburðina, að neikvæðu áhrifunum, þ.e.a.s. húðbólgu vegna snertiofnæmis. Í þessu tilviki er sameindaræsingin (þ.e. fyrsti lykilatburðurinn) samgild tenging rafsækinna efna við kjarnasækna miðju húðprótína. Annar lykilatburðurinn í þessu ferli neikvæðra afleiðinga fer fram í hyrnisfrumum og nær yfir bólguviðbrögð sem og breytingar á 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 virkjun og fjölgun T-frumna sem er metin óbeint í eitlagreiningu á músum (3. heimild).

2. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 442E um prófanir (2017). Þar er lýst greiningum *í glasi* þar sem fengist er við gangvirkin sem lýst er samkvæmt lykilatburðinum um virkjun angafruma í ferli neikvæðra afleiðinga m.t.t. húðnæmingar (2. heimild). Prófunaraðferðin inniheldur prófanir sem á að nota til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

   Prófanirnar sem lýst er í þessari prófunaraðferð eru:

   — Virkjunarprófun með frumulínu úr mönnum (h-CLAT-prófun)

   — Virkjunarprófun með U937-frumulínu (U-SENS™-prófun)

   — Vísigenspróf hvítfrumuboða-8 (IL-8 Luc-próf)

3. Prófanirnar sem þessi prófunaraðferð nær yfir og samsvarandi OECD-viðmiðunarregla um prófanir geta verið ólíkar með tilliti til verklagsins sem er notað til að afla gagnanna og aflestrarins sem er mældur en hægt er að nota þær án greinarmunar til að uppfylla kröfur landa um prófunarniðurstöður er varða lykilatburðinn um virkjun angafruma í ferli neikvæðra afleiðinga m.t.t. húðnæmingar og njóta um leið góðs af gagnkvæmri samþykkt gagna samkvæmt Efnahags- og framfarastofnuninni.

([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. EB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

Bakgrunnur og meginreglur prófananna sem falla undir prófunaraðferðina sem byggir á lykilatburðinum

4. Mat á húðnæmingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra. Með sígildum aðferðum þar sem naggrísir eru notaðir, prófun Magnusson og Kligman „Guinea Pig Maximisation Test (GPMT)“ (hámörkunarprófun á naggrísum) og „Buehler-prófun“ (prófunaraðferð B.6 (4. heimild)), eru bæði örvunar- og framköllunarstig húðnæmingar metin. Músaprófanir, eitlagreining (LLNA) (prófunaraðferð B.42 (3. heimild)) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, LLNA: DA (prófunaraðferð B.50 (5. heimild)) og LLNA: BrdU-ELISA (prófunaraðferð B.51 (6. heimild)), meta allar eingöngu viðbrögð við örvun og hafa einnig hlotið viðurkenningu því þær eru fremri prófunum á naggrísum með tilliti til velferðar dýra ásamt því að vera hlutlæg mæling á örvunarstigi húðnæmingar.

5. Nýlega voru prófunaraðferðir sem byggja á gangvirkjum í prófunum *í efni* og *í glasi* þar sem fengist er við fyrsta lykilatburðinn (prófunaraðferð B.59; bein prófun á hvarfgirni við peptíð (7. heimild)) og annan lykilatburðinn (prófunaraðferð B.60; prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsíferasa (8. heimild)) innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu samþykktar til að stuðla að því að meta hugsanlega hættu af húðnæmingarmætti íðefna.

6. Í prófunum, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, er magngreind annaðhvort breytingin á tjáningu frumuyfirborðsmarka sem tengist ferli við virkjun einkjörnunga og angafruma eftir váhrif frá næmandi efnum (t.d. CD54, CD86) eða breytingar á tjáningu IL-8, frumuboða sem tengist virkjun angafruma. Skýrt hefur verið frá því að húðnæmar örvi tjáningu frumuhimnumarka (e. *cell membrane marker*), s.s. CD40, CD54, CD80, CD83 og CD86, auk þess að örva bólgumyndandi frumuboða, s.s. IL-1β og TNF-α, og nokkra flakkboða, þ.m.t. IL-8 (CXCL8) og CCL3 (9.–12. heimild) sem tengjast virkjun angafruma (2. heimild).

7. Þar eð virkjun angafruma er einungis einn lykilatburður innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu (2. og 13. heimild) eru þó upplýsingar, sem er verða til með prófunum sem mæla einungis marka angafrumuvirkjunar, e.t.v. ekki nægilegar til að komast að niðurstöðu um hvort húðnæmingarmáttur íðefna er fyrir hendi eða ekki. Þess vegna er fyrirhugað að gögn, sem er aflað með prófunum sem er lýst í þessari prófunaraðferð, séu til stuðnings við að skilja á milli húðnæma (þ.e. í 1. undirflokki HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi þegar þau eru notuð innan samþættra aðferða við prófun og mat (IATA) ásamt öðrum viðbótarupplýsingum sem skipta máli, t.d. fengnar úr greiningum *í glasi* þar sem fengist er við aðra lykilatburði innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu sem og aðferðum án prófana, þ.m.t. ályktunum út frá byggingarlega hliðstæðum efnum um efnafræðilega hliðstæð efni. Dæmi um notkun á gögnum sem er aflað með þessum prófunum innan skilgreindra aðferða, þ.e. aðferða sem er staðlaðar bæði með tilliti til upplýsingaveita sem eru notaðar og aðferða sem er beitt á gögnin til að leiða út spár, hafa verið birt (13. heimild) og hægt er að nota þau sem gagnlega þætti innan samþættra aðferða við prófun og mat.

8. Ekki er hægt að nota prófanirnar, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, einar og sér, hvorki fyrir yfirvöld, sem nota þessa tvo valkvæðu undirflokka, 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 má nota jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með þessum aðferðum, einar og sér til að flokka íðefni í 1. undirflokk HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, háð reglurammanum.

9. Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa ([1]) og tengist ekki nothæfi prófana til að prófa efni með einum efnisþætti, fjölþáttaefni og/eða blöndur. Sem stendur eru takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi um nothæfi prófananna á fjölþáttaefni/blöndur (14. og 15. heimild). Tæknilega séð teljast prófanirnar samt sem áður nothæfar 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 ([2]). 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.

([1]) Á sameiginlegum fundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar í júní 2013 var einhugur um að beita ætti samræmdari notkun á hugtakinu „prófunaríðefni“, þegar unnt er, í nýjum og uppfærðum OECD-viðmiðunarreglum um prófanir til að lýsa því sem er prófað.

([2]) Þessi málsliður var lagður til og samþykktur á WNT-fundi í apríl 2014.

HEIMILDIR

1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Aðgengilegt á: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_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. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

3) Kafli B.42 í þessum viðauka: Eitlagreining

4) Kafli B.6 í þessum viðauka: Húðnæming.

5) Kafli B.50 í þessum viðauka: Húðnæming: DA-eitlagreining.

6) Kafli B.51 í þessum viðauka: Húðnæming: BrdU-ELISA-eitlagreining.

7) Kafli B.59 í þessum viðauka: Húðnæming í efni: Bein prófun á hvarfgirni við peptíð (DPRA).

8) Kafli B.60 í þessum viðauka: Húðnæming *í glasi*: Prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsíferasa.

9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: https://community.oecd.org/community/iatass.

14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

1. viðbætir

HÚÐNÆMING Í GLASI: VIRKJUNARPRÓFUN MEÐ FRUMULÍNU ÚR MÖNNUM (H-CLAT-PRÓFUN)

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

1. Í h-CLAT-prófun eru magngreindar breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarka sem tengjast ferlinu við virkjun einkjörnunga og angafruma (þ.e. CD86 og CD54) í frumulínu einkjörnungahvítblæðis úr mönnum, THP-1, eftir váhrif frá næmandi efnum (1.–2. heimild). Mæld gildi tjáningar frumuyfirborðsmarkanna CD86 og CD54 eru síðan til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.

2. Tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) lagði mat á h-CLAT-prófunina með samræmdri fullgildingarrannsókn og síðan fór fram óháð jafningjarýni af hálfu vísindalegrar ráðgjafarnefndar tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (ESAC). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum mælti tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (3. heimild) með því að h-CLAT-prófunin yrði notuð sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hættuflokkunar og merkinga. Dæmi um notkun á gögnum úr h-CLAT-prófun í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (4.–11. heimild).

3. Í ljós kom að h-CLAT-prófunin reyndist yfirfæranleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktunartækni og frumuflæðissjárgreiningum. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófuninni sé við 80% markið innan og milli rannsóknarstofa (3. og 12. heimild). Niðurstöður sem urðu til í fullgildingarrannsókninni (13. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (14. heimild) benda í heildina til þess að nákvæmni til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi sé 85% (N=142) með 93% næmi (94/101) og 66% sértæki (27/41) þegar hún er borin saman við niðurstöður úr eitlagreiningu (byggt á endurgreiningu tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (12. heimild) að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi gagna en ekki að teknu tilliti til neikvæðra niðurstaðna fyrir íðefni með Log K_{ow} sem er hærra en 3,5 eins og lýst er í 4. lið). Falsneikvæðar spár með h-CLAT-prófuninni eru líklegri til að varða 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) (4., 13. og 15. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að aðferðin h-CLAT-prófun sé gagnleg til að stuðla að því að greina hættu á húðnæmingu. Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir h-CLAT-prófunina sem sjálfstæða prófun, einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófunina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum. 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 mönnum.

4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist aðferðin h-CLAT-prófun nothæf til að prófa íðefni sem búa yfir ýmsum lífrænum virkum hópum, hvarfgöngum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknum *í lífi*) og eðlisefnafræðilegum eiginleikum (3. heimild og 14.–15. heimild). Aðferðin h-CLAT-prófun 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/burðarefninu í mismunandi fasa) í viðeigandi leysi/burðarefni (sjá 14. lið). Prófunaríðefni með Log K_{ow} sem er hærra en 3,5 hafa tilhneigingu til að framkalla falsneikvæðar niðurstöður (14. heimild). Þess vegna skal ekki taka tillit til neikvæðra niðurstaðna fyrir prófunaríðefni með Log K_{ow} sem er hærra en 3,5. Þó er enn hægt að nota jákvæðar niðurstöður sem fást með prófunaríðefnum með Log K_{ow} sem er hærra en 3,5 til að styðja greiningu prófunaríðefnisins sem húðnæmis. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumulínunnar sem er notuð (16. heimild) og vegna tilraunaskilyrðanna geta lífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem þurfa ensímvirkjun, t.d. fyrir milligöngu P450-ensíma), og ólífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem virkjast með oxun), einkum með hægum oxunarhraða, enn fremur gefið neikvæðar niðurstöður í h-CLAT-prófun (15. heimild). Hægt er að meta flúrskinsprófunaríðefni með h-CLAT-prófuninni (17. heimild) en engu að síður munu sterk flúrskinsprófunaríðefni, sem senda út á sömu bylgjulengd og ísóþíósýanat í flúrskinslausn (FITC) eða própidíumjoðíð, trufla frumuflæðissjárgreininguna og af þeim sökum er ekki hægt að meta það rétt með því að nota tilsvarandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn eða própidíumjoðíð. Í slíku tilviki er hægt að nota önnur flúrskinsmerkt mótefni eða aðra frumueiturhrifamarka, eftir því sem við á, svo fremi að hægt sé að sýna fram á að þeir gefi svipaðar niðurstöður og FITC-merkt mótefni (sjá 24. lið) eða própidíumjoðíð (sjá 18. lið) t.d. með því að prófa hæfnisefnin í 1.–2. viðbæti. Í ljósi framangreinds ætti að túlka neikvæðar niðurstöður með skírskotun til umræddra takmarkana og ásamt öðrum upplýsingaveitum innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að aðferðin h-CLAT-prófun sé ónothæf fyrir aðra tiltekna flokka prófunaríðefna skal ekki nota hana fyrir þessa tilteknu flokka.

5. Eins og lýst er hér að framan er aðferðin h-CLAT-prófun til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þó getur hún einnig hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti (4.–5. og 9. heimild) þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat. Samt sem áður er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr h-CLAT-prófun geta hugsanlega legið til grundvallar mati á mætti.

6. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 1.1.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Aðferðin h-CLAT-prófun er greining *í glasi* þar sem breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarka (þ.e. CD86 og CD54) eru magngreindar í línu einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum, THP-1-frumum, eftir váhrif frá prófunaríðefninu í 24 klukkustundir. Þessar yfirborðssameindir eru dæmigerðir markar fyrir virkjun THP-1-einkjörnunga og geta líkt eftir virkjun angafruma sem gegnir mikilvægu hlutverki við að setja T-frumur af stað. Breytingar á tjáningu yfirborðsmarka eru mældar með frumuflæðissjárgreiningu eftir frumulitun með flúrskinsmerktum mótefnum. Mælingar á frumueiturhrifum eru einnig gerðar samhliða til að meta hvort stýrð fjölgun í tjáningu yfirborðsmarka komi fram við styrk sem er undir frumueitrandi styrk. Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur yfirborðsmarka, samanborið við samanburð með leysi/burðarefni, er reiknaður út og notaður í spálíkaninu (sjá 26. lið) til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

8. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10 sem eru tilgreind í viðbæti 1.2. Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 11. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 20.–22. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

VERKFERLI

9. Þessi prófun er byggð á gagnagrunnsþjónustu h-CLAT-prófunar varðandi annars konar aðferðir en dýratilraunir (DB-ALM), aðferðarlýsingu nr. 158 (18. heimild), sem er aðferðarlýsingin sem var notuð í samræmdri fullgildingarrannsókn tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM). Mælt er með því að þessi aðferðarlýsing sé notuð þegar aðferðin h-CLAT-prófun er innleidd og notuð á rannsóknarstofu. Hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögun aðferðarinnar h-CLAT-prófun sem samanstendur af tveimur þrepum: *skammtaákvörðunarprófun* og *mæling á tjáningu CD86/CD54.*

Undirbúningur frumna

10. Nota skal frumulínu einkjörnungahvítblæðis úr mönnum, THP-1, til að framkvæma aðferðina h-CLAT-prófun. Mælt er með því að frumur (TIB-202™) séu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection“.

11. THP-1-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring (CO_2) og í RPMI-1640-æti með viðbættu 10% nautgripafósturssermi, 0,05 mM 2-merkaptóetanóli, 100 einingar/ml penisillíni og 100 µg/ml streptómýsíni. Hægt er að komast hjá því að nota penisillín og streptómýsín í ræktunarætinu. Í slíku tilviki skulu notendur þó sannreyna að þótt sýkladrepandi efni séu ekki fyrir hendi í ræktunarætinu hafi það ekki áhrif á niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin sem eru tilgreind í viðbæti 1.2. Til þess að lágmarka áhættu á mengun skal þó í öllum tilvikum fylgja góðum starfsvenjum við frumurækt, óháð því hvort sýkladrepandi efni eru fyrir hendi í frumuræktunarætinu eða ekki. THP-1-frumum er sáð kerfisbundið á tveggja til þriggja daga fresti með þéttleikann 0,1 til 0,2 × 10^6 frumur/ml. Þeim skal viðhaldið við þéttleikann frá 0,1 til 1,0 × 10^6 frumur/ml. Áður en frumurnar eru notaðar til prófunar skal hæfi þeirra athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Athugun á virkni frumnanna skal framkvæmd með því að nota jákvæðu samanburðina 2,4-dínítróklóróbensen (DNCB) (CAS-númer 97-00-7, ≥ 99% hreinleiki) og nikkelsúlfat ($NiSO_4$) (CAS-númer 10101-97-0, ≥ 99% hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (LA) (CAS-númer 50-21-5, ≥ 85% hreinleiki) tveimur vikum eftir afþíðingu. Bæði 2,4-dínítróklóróbensen og nikkelsúlfat eiga að framkalla jákvæða svörun hjá báðum frumuyfirborðsmörkunum CD86 og CD54 og mjólkursýra á að framkalla neikvæða svörun hjá báðum frumuyfirborðsmörkunum CD86 og CD54. Einungis skal nota þær frumur í prófunina sem stóðust athugun á virkni. Hægt er að láta frumur fjölga sér í allt að tvo mánuði eftir afþíðingu. Umsáningartala skal ekki fara yfir 30. Athugun á virkni skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 20.–24. lið.

12. Fyrir prófun er THP-1-frumum sáð með þéttleika sem nemur annaðhvort $0,1 \times 10^6$ frumum/ml eða $0,2 \times 10^6$ frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 72 klst. eða í 48 klst., eftir því sem við á. Mikilvægt er að frumuþéttleiki í ræktunarflöskunni rétt eftir forræktunartímabilið sé eins samræmdur og unnt er í hverri tilraun (með því að nota önnur hvor skilyrðin við forræktunina sem lýst er hér að framan) vegna þess að frumuþéttleikinn í ræktunarflöskunni rétt eftir forræktunartímabilið getur haft áhrif á tjáningu CD86/CD54 sem ofnæmisvaldar kalla fram (19. heimild). Á prófunardaginn eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, endurupplyestar með nýju ræktunaræti með 2×10^6 frumur/ml. Síðan er frumunum dreift í 24 holu bakka með flatri botnplötu (500 µl, 1×10^6 frumur/holu) eða í 96 holu bakka með flatri botnplötu (80 µl, $1,6 \times 10^5$ frumur/holu).

Skammtaákvörðunarprófun

13. Skammtaákvörðunarprófun er framkvæmd til að ákvarða CV75 sem er styrkur prófunaríðefnis sem leiðir til 75% lífvænleika frumna (CV) samanborið við samanburð með leysi/burðarefni. CV75-gildið er notað til að ákvarða styrk prófunaríðefna fyrir mælingu á tjáningu *CD86/CD54* (sjá 20.-24. lið.).

Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

14. Prófunaríðefni og samanburðaefni eru tilreidd á prófunardegi. Að því er varðar aðferðina h-CLAT-prófun eru prófunaríðefnin leyst upp í eða stöðug dreifilausn í (sjá einnig 4. lið) saltlausn eða æti sem fyrsti leysis-/burðarefnisvalkostur, eða dímetýlsúlfoxíði (DMSO, 99% hreinleiki) sem annar leysis-/burðarefnisvalkostur ef prófunaríðefnið er ekki uppleysanlegt eða myndar ekki stöðuga dreifilausn í fyrrnefndum tveimur leysum/burðarefnum, í lokastyrk sem nemur 100 mg/ml (í saltlausn eða æti) eða 500 mg/ml (í dímetýlsúlfoxíði). Nota má aðra leysa/önnur burðarefni en þau sem lýst er að framan ef færð eru fullnægjandi vísindaleg rök fyrir því. Taka skal tillit til stöðugleika prófunaríðefnisins í endanlegu(m) leysi/burðarefni.

15. Byrjað er á 100 mg/ml (í saltlausn eða æti) eða 500 mg/ml (í dímetýlsúlfoxíði) af stofnlausn prófunaríðefnisins og gera skal eftirfarandi þynningu í þrepum:

— Með saltlausn eða æti sem leysi/burðarefni: Átta stofnlausnir (8 styrkleikar) eru tilreiddar með tvöfaldri raðþynningu með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni. Þessar stofnlausnir eru þynntar enn frekar 50-falt í ræktunaræti (vinnulausnir). Ef hæsti lokastyrkur í bakka með 1 000 µg/ml er ekki eitraður skal endurákvarða hámarksstyrkinn með því að framkvæma nýtt frumueiturhrifapróf. Lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 5 000 µg/ml fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í saltlausn eða æti.

— Með dímetýlsúlfoxíð sem leysi/burðarefni: Átta stofnlausnir (8 styrkleikar) eru tilreiddar með tvöfaldri raðþynningu með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni. Þessar stofnlausnir eru þynntar enn frekar 250-falt í ræktunaræti (vinnulausnir).Lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 1 000 µg/ml jafnvel þótt þessi styrkleiki sé ekki eitraður.

Að lokum eru vinnulausnirnar notaðar til váhrifa með því að bæta sama rúmmáli af vinnulausn við rúmmál THP-1-frumusviflausnarinnar í bakkanum (sjá einnig 17. lið) til að ná fram tvöfaldri þynningu í viðbót (yfirleitt er endanleg röð styrkleika á bakkanum 7,81–1 000 µg/ml).

16. Samanburðurinn með leysi/burðarefni, sem er notaður í aðferðinni h-CLAT-prófun, er ræktunaræti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst eða stöðug dreifilausn (sjá 4. lið) annaðhvort með saltlausn eða æti) eða dímetýlsúlfoxíð (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í dímetýlsúlfoxíði) sem er prófað í einum lokastyrk í bakkanum við 0,2%. Hann er þynntur á sama hátt og lýst er fyrir vinnulausnirnar í 15. lið.

Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Ræktunaræti eða vinnulausnirnar, sem lýst er í 15. og 16. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusviflausnum sem eru tilreiddar í 24 holu eða 96 holu bakka með flatri botnplötu (sjá 12. lið). Meðhöndluðu bakkarnir eru síðan settir í ræktun í 24±0,5 klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO_2). Þess skal gætt að forðast uppgufun rokgjarnra prófunaríðefna og víxlmengun prófunaríðefna milli hola, t.d. með því að hylja bakkann fyrir ræktunina með prófunaríðefnunum (20. heimild).

Própidíumjoðíðlitun

18. Eftir váhrif í 24±0,5 klst. eru frumurnar færðar yfir í sýnaglös og safnað með skiljun. Flotinu er fleygt og frumurnar sem eftir eru eru endurupplеystar með 200 µl (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða 600 µl (ef um er að ræða 24 holu bakka) af fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur 0,1% af nautgripasermisalbúmíni (litunarjafnalausn). Tvö hundruð µl af frumusviflausn eru færðir yfir í 96 holu bakka með kúptri botnplötu (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða örtilraunaglas (ef um er að ræða 24 holu bakka) og þvegnir tvisvar með 200 µl (ef um er að ræða 96 holu bakka) eða 600 µl (ef um er að ræða 24 holu bakka) af litunarjafnalausn. Að lokum eru frumurnar endurupplеystar í litunarjafnalausn (t.d. 400 µl) og própidíumjoðíðlausn (t.d. 20 µl) er bætt við (lokastyrkur própidíumjoðíðlausnarinnar er t.d. 0,625 µg/ml). Nota má aðra frumueiturhrifamarka, s.s. 7-amínóaktínómýsín-D (7-AAD), trypan-bláan (e. *Trypan blue*) eða annað ef hægt er að sýna fram á að staðgöngulitir gefi svipaðar niðurstöður og própidíumjoðíð, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2.

Mælingar á frumueiturhrifum með frumuflæðissjárgreiningu og mati á CV75-gildi

19. Upptaka própidíumjoðíðs er greind með því að nota frumuflæðissjárgreiningu með aðfangarásina FL-3. Samtals 10 000 lifandi frumna (própidíumjoðíðneikvæðum) er aflað. Hægt er að reikna lífvænleika frumna út með eftirfarandi jöfnu í greiningarforriti frumumælisins. Ef lífvænleiki frumna er lítill skal afla allt að 30 000 frumna, þ.m.t. dauðar frumur. Að öðrum kosti er hægt að afla gagna í eina mínútu eftir að greiningin hefst.

$$Lífvænleiki\ frumna = \frac{Fjöldi\ lifandi\ frumna}{Heildarfjöldi\ frumna\ sem\ er\ aflað} \times\ 100$$

CV75-gildið (sjá 13. lið), þ.e. styrkur sem sýnir 75% af lifun THP-1-frumna (25% frumueiturhrif), er reiknað út með logralínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

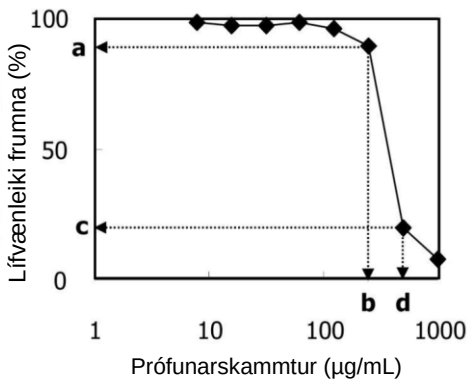
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Þar sem:

a er lágmarksgildi lífvænleika frumna yfir 75%

c er hámarksgildi lífvænleika frumna undir 75%

b og d eru styrkleikar sem sýna gildi lífvænleika frumna a og c, eftir því sem við á



Hægt er að nota aðrar aðferðir til að fá fram CV75 svo fremi að sýnt sé fram á að það hafi engin áhrif á niðurstöðurnar (t.d. með því að prófa hæfnisefnin).

Mæling á tjáningu CD86/CD54

Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

20. Viðeigandi leysir/burðarefni (saltlausn, æti eða dímetýlsúlfoxíð; sjá 14. lið.) er notað til að leysa prófunaríðefnin upp eða mynda stöðuga dreifilausn. Fyrst eru prófunaríðefnin þynnt í styrk sem samsvarar 100-faldri þynningu (saltlausn eða æti) eða 500-faldri þynningu (dímetýlsúlfoxíð) á 1,2 × CV75 sem er ákvarðað í skammtaákvörðunargreiningunni (sjá 19. lið). Ef ekki er hægt að ákvarða CV75 (þ.e. ef fullnægjandi frumueiturhrif koma ekki fram í skammtaákvörðunargreiningunni) skal nota hæsta styrk prófunaríðefnis sem er uppleyst eða myndar stöðuga dreifilausn, sem er tilreitt með hverjum leysi/hverju burðarefni, sem upphafsstyrk. Vakin er athygli á að lokastyrkurinn í bakkanum skal ekki fara yfir 5 000 µg/ml (ef um er að ræða saltlausn eða æti) eða 1 000 µg/ml (ef um er að ræða dímetýlsúlfoxíð). Þá eru útbúnar 1,2-faldar raðþynningar með því að nota samsvarandi leysi/burðarefni til að fá stofnlausnirnar (átta styrkleikar á bilinu frá 100×1,2 × CV75 til 100×0,335 × CV75 (saltlausn eða æti) eða frá 500×1,2 × CV75 til 500×0,335 × CV75 (dímetýlsúlfoxíð)) sem á að prófa með aðferðinni h-CLAT-prófun (sjá dæmi um skammtaáætlun í aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158). Stofnlausnirnar eru þynntar enn frekar 50-falt (saltlausn eða æti) eða 250-falt (dímetýlsúlfoxíð) í ræktunaræti (vinnulausnir). Þessar vinnulausnir eru að lokum notaðar til váhrifa með endanlegum tvöföldum þynningarstuðli í viðbót í bakkanum. Ef niðurstöðurnar uppfylla ekki samþykktarviðmiðanirnar, sem lýst er í 29. og 30. lið varðandi lífvænleika frumna, má endurtaka skammtaákvörðunarprófunina til að ákvarða nákvæmara CV75. Takið eftir að einungis er hægt að nota 24 holu bakka til að mæla tjáningu CD86/CD54.

21. Samanburður með leysi/burðarefni er tilreiddur eins og lýst er í 16. lið. Jákvæði samanburðurinn, sem er notaður í aðferðinni h-CLAT-prófun, er 2,4-dínítróklóróbensen (sjá 11. lið) og stofnlausnir fyrir hann eru tilreiddar í dímetýlsúlfoxíði og þynntar eins og lýst er fyrir stofnlausnirnar í 20. lið. Nota skal 2,4-dínítróklóróbensen sem jákvæðan samanburð fyrir mælingu á tjáningu CD86/CD54 í einum lokastyrkleika í bakkanum (yfirleitt 4,0 µg/ml). Til að fá styrkleikann 4,0 µg/ml af 2,4-dínítróklóróbenseni í bakka er tilreidd 2 mg/ml stofnlausn af 2,4-dínítróklóróbenseni í dímetýlsúlfoxíði og þynnt enn frekar, 250-falt með ræktunaræti, í vinnulausn sem nemur 8 µg/ml. Að öðrum kosti er einnig hægt að nota CV75-gildi 2,4-dínítróklóróbensens, sem er ákvarðað hjá hverri prófunarstöð fyrir sig, sem jákvæðan samanburðarstyrk. Nota má aðra heppilega jákvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur. Að því er varðar jákvæða samanburði skal eini lokastyrkleikinn í bakkanum ekki fara yfir 5 000 µg/ml (ef um er að ræða saltlausn eða æti) eða 1 000 µg/ml (ef um er að ræða dímetýlsúlfoxíð). Viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur eru þær sömu og lýst er fyrir prófunaríðefnið (sjá 29. lið) nema að því er varðar síðustu samþykktarviðmiðunina þar sem jákvæði samanburðurinn er prófaður við einn styrkleika.

Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

22. Að því er varðar hvert prófunaríðefni og samanburðarefni þarf eina tilraun til að fá fram spá. Hver tilraun samanstendur af a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum fyrir mælingu á tjáningu CD86/CD54 (sjá 26.–28. lið). Hver sjálfstæð keyrsla er gerð á mismunandi degi eða sama dag að því tilskildu að fyrir hverja keyrslu sé(u): a) sjálfstæð ný stofnlausn og vinnulausnir prófunaríðefnisins og mótefnalausnanna tilreiddar og b) notaðar frumur sem eru heimtar ósamfellt (þ.e. frumurnar eru heimtar úr mismunandi ræktunarflöskum); þó mega frumurnar koma úr sömu umsáningu. Prófunaríðefni og samanburðarefni, tilreidd sem vinnulausnir (500 µl), eru blönduð með 500 µl af enduruppleystum frumum ($1x10^6$ frumur) í hlutfallinu 1:1 og frumurnar eru settar í ræktun í 24±0,5 klst eins og lýst er í 20. og 21. lið. Í hverri keyrslu er nóg að vera með eina samhliða prófun fyrir hvern styrkleika prófunaríðefnisins og samanburðarefnisins þar sem spá er fengin úr a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum.

Frumulitun og greining

23. Eftir váhrif í 24±0,5 klst. eru frumurnar færðar úr 24 holu bakka yfir í sýnaglös, safnað með skiljun og síðan þvegnar tvisvar með 1 ml af litunarjafnalausn (ef nauðsyn krefur má bæta við þvottaþrepum). Eftir þvott eru frumurnar blokkaðar með blokklausn (litunarjafnalausn sem inniheldur 0,01% (massi miðað við rúmmál) af glóbúlíni (Cohn-þáttur II, III, úr mönnum; SIGMA, #G2388-10G eða jafngildi)) og settar í ræktun við 4 °C í 15 mínútur. Eftir blokkun er frumunum skipt niður í þrjá 180 µl deiliskammta í 96 holu bakka með kúptri botnplötu eða örtilraunaglas.

24. Eftir skiljun eru frumurnar litaðar með 50 µl af FITC-merktum mótefnum af tegundinni and-CD86-, and-CD54- eða IgG1 (flokkur) úr músum við 4 °C í 30 mínútur. Mótefnin, sem lýst er í h-CLAT aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158 (18. heimild), skulu notuð með því að þynna 3:25 rúmmálshlutfall (fyrir CD86: (BD-PharMingen, #555657; klón: Fun-1)) eða 3:50 rúmmálshlutfall (fyrir CD54: (DAKO, #F7143; klón: 6.5B5) og IgG1 (DAKO, #X0927)) með litunarjafnalausn. Hönnuðir prófunarinnar skilgreindu þessa mótefnaþynningarstuðla sem þá sem gáfu besta suðhlutfallið. Á grundvelli

reynslu hönnuða prófunarinnar er flúrljómunarstyrkur mótefnanna yfirleitt svipaður milli mismunandi lota. Þó geta notendur íhugað að títra mótefnin við eigin rannsóknarstofuskilyrði til að skilgreina bestu styrkleikana til að nota. Nota má önnur flúrskinsmerkt and-CD86- og/eða and-CD54-mótefni ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður og tilsvarandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2. Það skal tekið fram að breyting á klóni eða birgi mótefnanna, eins og lýst er í h-CLAT aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 158 (18. heimild), getur haft áhrif á niðurstöðurnar. Eftir þvott, tvisvar sinnum eða oftar, með 150 µl af litunarjafnalausn eru frumurnar enduruppleystar í litunarjafnalausn (t.d. 400 µl) og própidíumjoðíðlausn (t.d. 20 µl til að fá lokastyrk sem nemur 0,625 µg/ml) eða annarri frumueiturhrifamarkalausn (sjá 18. lið) er bætt við. Gildi tjáningar CD86 og CD54 og lífvænleiki frumna eru greind með frumuflæðissjárgreiningu.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

25. Tjáning CD86 og CD54 er greind með frumuflæðissjárgreiningu með aðfangarásina FL-1. Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD86 og CD54 fyrir jákvæðar samanburðarfrumur og íðefnameðhöndlaðar frumur er reiknaður út, byggt á faldmeðaltali flúrljómunarstyrks (MFI), samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$RFI = \frac{MFI\ fyrir\ íðefnameðhöndlaðar\ frumur - MFI\ fyrir\ íðefnameðhöndlaðan\ flokk\ samanburðarfrumna}{MFI\ fyrir\ leysi/burðarefnismeðhöndlaðar\ samanburðarfrumur - MFI\ fyrir\ leysi/burðarefnismeðhöndlaður\ flokkur\ samanburðarfrumna} \times 100$$

Lífvænleiki frumna úr flokki samanburðarfrumna (sem eru litaðar með IgG1- (flokkur) mótefnum úr músum) er einnig reiknaður út samkvæmt jöfnunni sem lýst er í 19. lið.

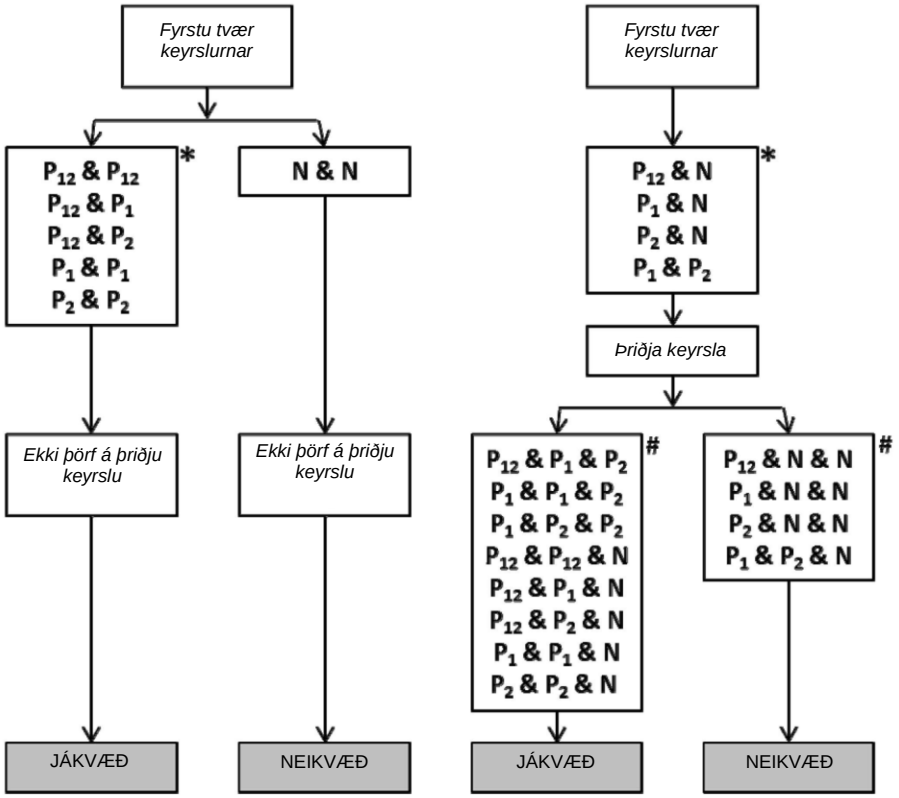
Spálíkan

26. Að því er varðar mælingu á tjáningu CD86/CD54 er hvert prófunaríðefni prófað í a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum til að leiða út eina spá (JÁKVÆÐA eða NEIKVÆÐA). Spá með h-CLAT-prófun er talin JÁKVÆÐ ef a.m.k. eitt af eftirfarandi skilyrðum er uppfyllt í 2 af 2 eða í a.m.k. 2 af 3 sjálfstæðum keyrslum, að öðrum kosti telst spá með h-CLAT-prófun vera NEIKVÆÐ (mynd 1):

— Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD86 er jafn eða meiri en 150% í öllum prófuðum styrkleikum (með lífvænleika frumna ≥ 50%).

— Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) CD54 er jafn eða meiri en 200% í öllum prófuðum styrkleikum (með lífvænleika frumna ≥ 50%).

27. Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar jákvæðar fyrir CD54 er spá með h-CLAT-prófun talin JÁKVÆÐ á grundvelli framangreinds og ekki er þörf á að framkvæma þriðju keyrsluna. Á sama hátt, ef fyrstu tvær keyrslurnar eru neikvæðar fyrir báðum mörkunum, telst spá með h-CLAT-prófuninni NEIKVÆÐ (að teknu tilhlýðilegu tilliti til ákvæðanna í 30. lið) án þess að það þurfi að keyra þriðju keyrsluna. Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru ekki samsvarandi fyrir a.m.k. annan markann (CD54 eða CD86) er þó þörf á þriðju keyrslunni og endanleg spá verður byggð á niðurstöðu úr meirihluta keyrslnanna þriggja, hverri um sig, (þ.e. 2 af 3). Að því er þetta varðar skal bent á að ef tvær sjálfstæðar keyrslur eru framkvæmdar og önnur er einungis jákvæð fyrir CD86 (hér á eftir nefnd P_1) og hin er einungis jákvæð fyrir CD54 (hér á eftir nefnd P_2) þarf að keyra þriðju keyrsluna. Ef þriðja keyrslan er neikvæð fyrir báðum mörkunum (hér á eftir nefnt N) telst spá með h-CLAT-prófuninni NEIKVÆÐ. Ef þriðja keyrslan er jákvæð fyrir öðrum hvorum markanum (P_1 eða P_2) eða fyrir báðum mörkunum (hér á eftir nefnt P_{12}) er spáin með h-CLAT-prófuninni talin JÁKVÆÐ.



Mynd 1 Spálíkan sem er notað í aðferðinni h-CLAT-prófun. Spá með h-CLAT-prófun skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum.

P_1: keyrsla þar sem einungis CD86 er jákvæður; P_2; keyrsla þar sem einungis CD54 er jákvæður; P_{12}: keyrsla þar sem bæði CD86 og CD54 eru jákvæðir; N: keyrsla þar sem hvorki CD86 né CD54 eru jákvæðir.

* Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr tveimur fyrstu keyrslunum, óháð því í hvaða röð þær kunna að hafa fengist.

Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr þremur keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust úr tveimur fyrstu keyrslunum, sem eru sýndar í reitnum hér að framan, en endurspegla ekki í hvaða röð þær kunna að hafa fengist.

28. Að því er varðar prófunaríðefni, sem spáð er fyrir um að séu jákvæð með h-CLAT-prófun, er hægt að ákveða tvö hrifstyrksgildi (EC-gildi), EC150 fyrir CD86 og EC200 fyrir CD54, þ.e. við hvaða styrk prófunaríðefnin kölluðu fram hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) sem nemur 150 eða 200. Þessi EC-gildi geta hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti (9. heimild) þegar þau eru notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat (4.–8. heimild). Þau er hægt að reikna út með eftirfarandi jöfnum:

$$EC\ 150\ (fyrir\ CD86) = B_{styrkur} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{styrkur} - B_{styrkur})]$$

$$EC\ 200\ (fyrir\ CD86) = B_{styrkur} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{styrkur} - B_{styrkur})]$$

þar sem

$A_{styrkur}$ er lægsti styrkur í µg/ml með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) > 150 (CD86) eða 200 (CD54)

$B_{styrkur}$ er hæsti styrkur í µg/ml með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) < 150 (CD86) eða 200 (CD54)

A_{RFI} er hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) við lægsta styrk með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) > 150 (CD86) eða 200 (CD54)

B_{RFI} er hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI) við hæsta styrk með hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI) < 150 (CD86) eða 200 (CD54)

Í þeim tilgangi að leiða gildi EC150 og EC200 út af meiri nákvæmni getur verið þörf á þremur sjálfstæðum keyrslum til að *mæla tjáningu* CD86/CD54. Endanleg gildi EC150 og EC200 eru síðan ákvörðuð sem miðgildi EC-gilda sem eru reiknuð út frá sjálfstæðu keyrslunum þremur. Ef einungis tvær af þremur sjálfstæðum keyrslum uppfylla viðmiðanir um jákvæðni (sjá 26.–27. lið) er hærra útreiknaða gildið af þessum tveimur útreiknuðu gildum, EC150 eða EC200, notað.

Samþykktarviðmiðanir

29. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar aðferðin h-CLAT-prófun er notuð (22. og 27. heimild).

— Lífvænleiki frumna í samanburði með æti og samanburði með leysi/burðarefni skal vera yfir 90%.

— Í samanburði með leysi/burðarefni skulu gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) bæði CD86 og CD54 ekki fara yfir jákvæðu viðmiðanirnar (CD86 RFI 150% og CD54 RFI 200%). Gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) í samanburði með leysi/burðarefni eru reiknuð út með jöfnunni sem lýst er í 25. lið (í staðinn fyrir „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir íðefni“ kemur „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með leysi/burðarefni“ og í staðinn fyrir „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með leysi/burðarefni“ kemur „faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir samanburð með æti“).

— Að því er varðar bæði samanburð með æti og samanburð með leysi/burðarefni skal hlutfallið milli faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) fyrir bæði CD86 og CD54 og flokkssamanburðarins vera > 105%.

— Í jákvæða samanburðinum (2,4-dínítróklóróbensen) skulu gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) fyrir bæði CD86 og CD54 uppfylla jákvæðu viðmiðanirnar (CD86 RFI 150 og CD54 RFI 200) og lífvænleiki frumna skal vera yfir 50%.

— Að því er varðar prófunaríðefni skal lífvænleiki frumna vera yfir 50% í a.m.k. fjórum prófuðum styrkleikum í hverri keyrslu.

30. Aðeins er hægt að viðurkenna neikvæðar niðurstöður fyrir prófunaríðefni sem sýna minni lífvænleika frumna en 90% við hæsta styrk sem er prófaður (þ.e. 1,2 × CV75 samkvæmt raðþynningaráætluninni sem er lýst í 20. lið). Ef lífvænleiki frumna við 1,2 × CV75 er jafn eða hærri en 90% skal ekki nota neikvæðu niðurstöðurnar. Í slíku tilviki er mælt með því að reyna að betrumbæta val á skömmtum með því að endurtaka ákvörðunina á CV75. Það skal bent á að þegar 5 000 µg/ml í saltlausn (eða æti eða öðrum leysum/burðarefnum), 1 000 µg/ml í dímetýlsúlfoxíði eða hæsti leysanlegi styrkur er notaður sem hámarksprófunarstyrkur prófunaríðefnis er hægt að viðurkenna neikvæðar niðurstöður jafnvel þótt lífvænleiki frumna sé yfir 90%.

Prófunarskýrsla

31. 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, Log K_{ow}, 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.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda

— Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), 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.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Samanburður

Jákvæður samanburður

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, Log K_{ow}, 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.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

Neikvæður samanburður og samanburður með leysi/burðarefni

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla 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 samanburðir með leysi/öðrum burðarefnum eru notuð en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir og að því marki sem unnt er.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Prófunarskilyrði

— Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

— Lýsing á prófun sem er notuð.

— Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).

— Frumuflæðissjárgreining sem er notuð (t.d. líkan), þ.m.t. stillingar á tæki, glóbúlín, mótefni og frumueiturhrifamarkar sem eru notaðir.

— Verklag sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunina með því að prófa hæfnisefnin og verklag sem er notað til að sýna fram á að samanburðarnákvæmni prófunarinnar sé viðhaldið yfir lengri tíma, t.d. rannsóknarsöguleg samanburðargögn og/eða söguleg gögn um athuganir á virkni.

Viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar

— Lífvænleiki frumna, gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) og hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI), sem fást með samanburði með leysi/burðarefni, í samanburði við ásættanleikasviðin.

— Lífvænleiki frumna og gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI), sem fást með jákvæðum samanburði, í samanburði við ásættanleikasviðin.

— Lífvænleiki frumna í öllum prófuðum styrkleikum prófaða íðefnisins.

Prófunaraðferð

— Fjöldi keyrslna sem er notaður.

— Styrkur prófunaríðefna, íbæting 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 öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

Niðurstöður

— Töflusetning gagnanna, þ.m.t. CV75 (ef við á), einstök rúmfræðileg gildi fyrir faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) og hlutfallslegan flúrljómunarstyrk (RFI), gildi fyrir lífvænleika frumna, gildi fyrir EC150/EC200 (ef við á), sem fást fyrir prófunaríðefnið og fyrir jákvæða samanburðinn í hverri keyrslu, og upplýsingar um flokkun prófunaríðefnis samkvæmt spálíkaninu.

— Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

— Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með aðferðinni h-CLAT-prófun.

— Athugun á niðurstöðum prófunarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

Ályktanir

HEIMILDIR

1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767–773.

2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Aðgengilegt á: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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 potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Aðgengilegt á: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

16) 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.

17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Aðgengilegt á: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H,, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 bls.

22) 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. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth 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_rev05/05files_e.html

24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Viðbætir 1.1

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófun (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* (22. heimild).

Íðefni: Efni eða blanda.

CV75: Áætlaður styrkur sem sýnir 75% lífvænleika frumna.

EC150: styrkur sem sýnir gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) sem nemur 150 í tjáningu CD86.

EC200: styrkur sem sýnir gildi hlutfallslegs flúrljómunarstyrks (RFI) sem nemur 200 í tjáningu CD54.

Frumuflæðissjárgreining: frumumælingartækni þar sem frumur, sem eru leystar upp í vökva, flæða ein í einu gegnum brennipunkt segulmögnunarljósgeisla (e. *focus of exciting light*) sem dreifist í mynstri sem er einkennandi fyrir frumurnar og hluta þeirra; frumurnar eru oft merktar með flúrmerkiefnum þannig að fyrst er ljósið ísogað en síðan sent út á annarri tíðni.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur 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

Samanburður með æti: 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/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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: 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.

Ólífrænt umbreyttir meðvakar: íðefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera.

Lífrænt umbreyttir meðvakar: íðefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

Hlutfallslegur flúrljómunarstyrkur (RFI): Hlutfallsleg gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) í íðefnameðhöndluðum frumum samanborið við faldmeðaltal flúrljómunarstyrks (MFI) í leysis-/burðarefnismeðhöndluðum frumum.

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) prófunar (21. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðar-nákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (21. heimild).

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (21. heimild).

Litunarjafnalausn: Fosfatstillt saltlausn sem inniheldur 0,1% af nautgripasermisalbúmíni.

Samanburður með leysi/burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (21. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari aðferð.

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 (23. heimild).

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófun: Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (21. heimild).

Viðbætir 1.2

HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, 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 h-CLAT-prófuninni fyrir hæfnisefnin 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram CV75-, EC150- og EC200-gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 10. Hæfnisefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin eru fáanleg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir *í lífi*, sem og um rannsóknir *í glasi*, sem verða til með aðferðinni h-CLAT-prófun eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir aðferðina h-CLAT-prófun (3. og 14. heimild).

Tafla 1

Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir aðferðina h-CLAT-prófun

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá *í lífi* (1)	CV75-viðmiðunarbil í µg/ml (2)	Niðurstöður h-CLAT-prófunar fyrir CD86 (EC150-viðmiðunarbil í µg/ml) (3)	Niðurstöður h-CLAT-prófunar fyrir CD54 (EC150-viðmiðunarbil í µg/ml) (4)
2,4-dínítróklóróbensen	97-00-7	Fast efni	Næmir (mjög sterkur)	2–12	Jákvæðar (0,5–10)	Jákvæðar (0,5–15)
4-fenýlendíamín	106-50-3	Fast efni	Næmir (sterkur)	5–95	Jákvæðar (<40)	Neikvæðar (>1,5) (3)
Nikkelsúlfat	10101-97-0	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	30–500	Jákvæðar (<100)	Jákvæðar (10–100)
2-merkaptbensóþíasól	149-30-4	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	30–400	Neikvæðar (>10) (3)	Jákvæðar (10–140)
R(+)-límónen	5989-27-5	Vökvi	Næmir (vægur)	>20	Neikvæðar (>5) (3)	Jákvæðar (<250)
Imídasólidínúrea	39236-46-9	Fast efni	Næmir (vægur)	25–100	Jákvæðar (20–90)	Jákvæðar (20–75)
Ísóprópanól	67-63-0	Vökvi	Ekki næmir	>5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Ekki næmir	>5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	1500–5000	Neikvæðar (>5000)	Neikvæðar (>5000)
4-amínóbensósýra	150-13-0	Fast efni	Ekki næmir	>1000	Neikvæðar (>1000)	Neikvæðar (>1000)

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

(1) Spá um hættu *í lífi* og (mátt) byggist á eitlagreiningargögnum (3. og 14. 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) Byggt á sögulegum mældum gildum (13. og 25. heimild).

(3) Sögulega séð hafa neikvæðar niðurstöður verið í meirihluta fyrir þennan marka og þess vegna er aðallega búist við neikvæðri niðurstöðu. Styrkbilið sem var gefið var skilgreint á grundvelli þessara fáu sögulegu jákvæðu niðurstaðna sem fengust. Ef jákvæð niðurstaða fæst ætti EC-gildi að vera innan tilgreinds viðmiðunarbils.

2. viðbætir

HÚÐNÆMING Í GLASI: VIRKJUNARPRÓFUN U937-FRUMULÍNU (U-SENS™-PRÓFUN)

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

1. Í U-SENS™-prófun eru magngreindar breytingar á tjáningu frumuyfirborðsmarka sem tengjast ferlinu við virkjun einkjörnunga og angafruma (þ.e. CD86) í U937-frumulínu eitilfrumukrabbameins í mönnum eftir váhrif frá næmandi efnum (1. heimild). Mæld gildi tjáningar CD86-frumuyfirborðsmarkans í U937-frumulínunni er síðan notað til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.

2. U-SENS™-prófunin var metin í fullgildingarrannsókn (2. heimild) sem var samræmd af L'Oreal og síðan fór fram óháð jafningjarýni af hálfu vísindalegrar ráðgjafarnefndar tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (3. heimild). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum mælti tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (4. heimild) með því að U-SENS™-prófunin yrði notuð sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hættuflokkunar og merkinga. Sem stendur fjallar Efnahags- og framfarastofnunin um nokkrar raundæmarannsóknir, þar sem mismunandi prófunaráætlunum og spálíkönum er lýst, í leiðbeiningarskjali sínu um skýrslugjöf um skipulagðar aðferðir við samþættingu gagna og einstakra upplýsingaveita sem eru notaðar innan samþættra aðferða við prófun og mat vegna húðnæmingar. Ein af mismunandi skilgreindum aðferðum er byggð á U-SENS-greiningunni (5. heimild). Einnig er gerð grein fyrir dæmum um notkun á gögnum úr U-SENS™-prófun í samsetningu með öðrum upplýsingum, þ.m.t. söguleg gögn og fyrirliggjandi gild gögn um menn (6. heimild), annars staðar í heimildum (4.–5. heimild og 7. heimild).

3. Í ljós kom að U-SENS™-prófunin reyndist yfirfæranleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktunartækni og frumuflæðissjárgreiningum. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófuninni sé við 90% og 84% markið innan og milli rannsóknarstofa, eftir því sem við á (8. heimild). Niðurstöður sem urðu til í fullgildingarrannsókninni (8. heimild) og aðrar birtar rannsóknir (1. heimild) benda í heildina til þess að nákvæmni til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi sé 86% (N=166) með 91% næmi (118/129) og 65% sértæki (24/37) þegar hún er borin saman við niðurstöður úr eitlagreiningu. Samanborið við niðurstöður að því er varðar menn er nákvæmnin til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi 77% (N=101) með 100% næmi (58/58) og 47% sértæki (20/43). Falsneikvæðar spár með U-SENS™-prófuninni, samanborið við eitlagreiningu, eru líklegri til að varða 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) (1., 8. og 9. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að U-SENS™-prófunin sé gagnleg til að stuðla að því að greina áhættu á húðnæmingu. Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir U-SENS™-prófunina sem sjálfstæða prófun, einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófunina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna inngangsinum. 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 mönnum.

4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist U-SENS™-prófunin nothæf til að prófa íðefni (þ.m.t. innihaldsefni í snyrtivörur, t.d. rotvarnarefni, yfirborðsvirk efni, virk efni og litarefni) sem búa yfir ýmsum líffrænum virkum hópum, eðlisefnafræðilegum eiginleikum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknum *í lífi*) og sýna svið hvarfganga sem vitað er að tengjast húðnæmingu (þ.e. sem fela í sér Michael-þega, Schiff-basamyndun, asýlfærsluefni, kjarnasækin tveggja sameinda skiptihvörf [SN2] eða kjarnasækin arómatísk skiptihvörf [SNAr]) (1. og 8.–10. heimild). U-SENS™-prófunin hentar fyrir prófunaríðefni sem eru leysanleg eða sem mynda stöðuga dreifilausn (þ.e. með svifögnum eða í sviflausn þar sem prófunaríðefnið hvorki sest né skilur sig frá leysinum/burðarefninu í mismunandi fasa) í viðeigandi leysi/burðarefni (sjá 13. lið). Með U-SENS™-prófuninni (1. og 10. heimild) var spáð rétt fyrir um íðefni sem gefin eru upp í gagnamenginu sem líffrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem virkjast með oxun) eða ólíffrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. efni sem þurfa ensímvirkjun, t.d. fyrir milligöngu P450-ensíma). Himnutruflandi efni geta leitt til falsjákvæðra

niðurstaðna vegna ósértækrar aukningar á tjáningu CD86 þar sem 3 af 7 falsjákvæðum svörum í tengslum við viðmiðunarflokkunina *í lífi* voru yfirborðsvirk efni (1. heimild). Gæta skal varúðar varðandi slíkar jákvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum en á hinn bóginn er enn unnt að nota neikvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum til að styðja við greiningu á íðefni sem efni sem er ekki næmandi. Hægt er að meta flúrskinsprófunaríðefni með U-SENS™-prófuninni (1. heimild) en engu að síður munu sterk flúrskinsprófunaríðefni, sem senda út á sömu bylgjulengd og ísóþíósýanat í flúrskinslausn (FITC) eða própidíumjoðíð, trufla frumuflæðissjárgreininguna og af þeim sökum er ekki hægt að meta þau rétt með því að nota tilsvarandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn (hugsanlega falsneikvæðar niðurstöður) eða própidíumjoðíð (lífvænleiki ekki mælanlegur). Í slíku tilviki er hægt að nota önnur flúrskinsmerkt mótefni eða aðra frumueiturhrifamarka, eftir því sem við á, svo fremi að hægt sé að sýna fram á að þeir gefi svipaðar niðurstöður og FITC-merkt mótefni eða própidíumjoðíð (sjá 18. lið), t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Í ljósi framangreinds ætti að túlka jákvæðar niðurstöður með yfirborðsvirkum efnum og neikvæðar niðurstöður með sterkum flúrskinsprófunaríðefnum með skírskotun til umræddra takmarkana og ásamt öðrum upplýsingaveitum innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að U-SENS™-prófunin sé ónothæf fyrir aðra tiltekna flokka prófunaríðefna skal ekki nota hana fyrir þessa tilteknu flokka.

5. Eins og lýst er hér að framan er U-SENS™-prófunin til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þó getur hún einnig hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat. Samt sem áður er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr U-SENS™-prófun geta hugsanlega legið til grundvallar mati á næmingarmætti.

6. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 2.1.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. U-SENS™-prófunin er greining *í glasi* þar sem breytingar á tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka eru magngreindar í frumulínu eitilfrumukrabbameins í mönnum, U937-frumur, eftir váhrif frá prófunaríðefninu í 45±3 klukkustundir. Yfirborðsmarkinn CD86 er dæmigerður marki fyrir virkjun U937. Vitað er að CD86 er samörvandi sameind sem getur líkt eftir virkjun einkjörnunga sem gegnir mikilvægu hlutverki við að setja T-frumur af stað. Breytingar á tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka eru mældar með frumuflæðissjárgreiningu eftir frumulitun, yfirleitt með FITC-merktum mótefnum. Mælingar á frumueiturhrifum eru einnig gerðar samhliða (t.d. með því að nota própidíumjoðíð) til að meta hvort stýrð fjölgun í tjáningu CD86-frumuyfirborðsmarka komi fram við styrk sem er undir frumueitrandi styrk. Örvunarstuðull (S.I.) CD86-frumuyfirborðsmarka, samanborið við samanburð með leysi/burðarefni, er reiknaður út og notaður í spálíkaninu (sjá 19. lið) til stuðnings við að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

8. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10, sem eru tilgreind í viðbæti 2.2, í samræmi við góðar starfsvenjur við aðferðir *í glasi* (11. heimild). Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 11. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 15.–16. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

VERKFERLI

9. Þessi prófun er byggð á gagnagrunnsþjónustu U-SENS™-prófunar varðandi annars konar aðferðir en dýratilraunir (DB-ALM), aðferðarlýsingu nr. 183 (12. heimild). Staðlaðar verklagsreglur fyrir U-SENS™-prófunina skulu notaðar þegar hún er innleidd og notuð á rannsóknarstofu. Hægt er að nota sjálfvirkt kerfi til að keyra U-SENS™-prófunina ef hægt er að sýna fram á að það gefi svipaðar niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögun U-SENS™-prófunarinnar.

Undirbúningur frumna

10. Nota skal frumulínu eitilfrumukrabbameins í mönnum, U937-frumur (13. heimild), til að framkvæma U-SENS™-prófunina. Frumur (klón CRL1593.2) skulu fengnar frá viðurkenndu frumusafni, s.s. „American Type Culture Collection“.

11. U937-frumur eru ræktaðar í rakabættu andrúmslofti við 37 °C og 5% koltvísýring (CO_2) og í RPMI-1 640-æti með viðbættu 10% nautgripafósturssermi, 2 mM L-glútamíni, 100 einingum/ml penisillíni og 100 µg/ml streptómýsíni (tilbúið æti). U937-frumum er umsáð kerfisbundið á tveggja til þriggja daga fresti með þéttleikann 1,5 til 3 × 10^5 frumur/ml, eftir því sem við á. Frumuþéttleiki skal ekki fara yfir 2 × 10^6 frumur/ml og lífvænleiki frumna, mældur með útilokun með trypan-bláum, skal vera ≥ 90% (skal ekki beitt við fyrstu umsáningu eftir afþíðingu). Áður en hver lota af frumum, nautgripafósturssermi eða sýklalyfjum er notuð til prófunar skal hæfi hennar athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Athugun á virkni frumnanna skal framkvæmd með því að nota jákvæða samanburðinn píkrýlsúlfónsýru (2,4,6-trínítróbensensúlfónsýra: TNBS) (CAS-númer 2 508-19-2, ≥ 99% hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (CAS-númer 50-21-5, ≥ 85% hreinleiki) a.m.k. viku eftir afþíðingu. Fyrir athugun á virkni skal prófa sex lokastyrkleika fyrir hvorn samanburð fyrir sig af tveimur (trínítróbensensúlfónsýra: 1, 12.5, 25, 50, 75, 100µg/ml og mjólkursýra: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). Trínítróbensensúlfónsýra, sem er leyst upp í tilbúnu æti, á að veita jákvæða og styrkleikatengda svörun hjá CD86 (t.d. þegar jákvæðum styrk, CD86 með örvunarstuðulinn (S.I.) ≥ 150, er fylgt eftir með styrk með hækkandi örvunarstuðli (S.I.) CD86) og mjólkursýra sem er leyst upp í tilbúnu æti á að veita neikvæða svörun hjá CD86 (sjá 21. lið). Einungis skal nota þá frumulotu, sem stóðst athugun á virkni tvisvar sinnum, í greininguna. Hægt er að láta frumur fjölga sér í allt að sjö vikur eftir afþíðingu. Umsáningartala skal ekki fara yfir 21. Athugun á virkni skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 18.–22. lið.

12. Fyrir prófun er U937-frumum sáð með þéttleika sem nemur annaðhvort 3 × 10^5 frumum/ml eða 6 × 10^5 frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 2 daga eða í 1 dag, eftir því sem við á. Nota má önnur forræktunarskilyrði en þau sem lýst er hér að framan ef færð eru fullnægjandi, vísindaleg rök fyrir því og ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Á prófunardaginn eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, enduruppleystar með nýjum ræktunarmiðli með 5 × 10^5 frumur/ml. Síðan er frumunum dreift í 96 holu bakka með flatri botnplötu með 100 µl (endanlegur frumuþéttleiki er 0,5 × 10^5 frumur/holu).

Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

13. Mat á leysni er framkvæmt á undan prófuninni. Í þessu skyni eru prófunaríðefni leyst upp eða stöðug dreifilausn mynduð við styrk sem nemur 50 mg/ml í tilbúnu æti sem fyrsti leysisvalkostur, eða í dímetýlsúlfoxíði (dímetýlsúlfoxíð 99% hreinleiki) sem annar leysis-/burðarefnisvalkostur. ef prófunaríðefnið er ekki leysanlegt í tilbúnu æti með leysi/burðarefni. Fyrir prófunina er prófunaríðefnið leyst upp í lokastyrk sem nemur 0,4 mg/ml tilbúnu æti ef íðefnið er leysanlegt í þessum leysi/þessu burðarefni. Ef íðefnið er einungis leysanlegt í dímetýlsúlfoxíði er það leyst upp við styrk sem nemur 50 mg/ml. Nota má aðra leysa/önnur burðarefni en þau sem lýst er að framan ef færð eru fullnægjandi vísindaleg rök fyrir því. Taka skal tillit til stöðugleika prófunaríðefnisins í endanlegu(m) leysi/burðarefni.

14. Prófunaríðefni og samanburðaefni eru tilreidd á prófunardegi. Þar eð skammtaákvörðunargreining er ekki framkvæmd fyrir fyrstu keyrsluna skal prófa 6 lokastyrkleika (1, 10, 20, 50, 100 og 200 µg/ml) í samsvarandi /leysi/burðarefni, annaðhvort í tilbúnu æti eða í 0,4% dímetýlsúlfoxíði í æti. Fyrir síðari keyrslur eru tilreiddar a.m.k. 4 vinnulausnir (þ.e. a.m.k. 4 styrkleikar) af prófunaríðefnunum þar sem byrjað er á 0,4 mg/ml í tilbúnu æti eða 50 mg/ml í dímetýlsúlfoxíði og notaður samsvarandi leysir/burðarefni. Vinnulausnirnar eru að lokum notaðar til meðferðar með því að bæta sama rúmmáli af U937-frumusviflausn (sjá 11. lið hér að framan) við rúmmál vinnulausnanna í bakkanum til að ná fram tvöfaldri þynningu í viðbót (12. heimild). Styrkleikarnir (a.m.k. 4 styrkleikar) fyrir frekari keyrslur eru valdir á grundvelli niðurstaðna úr öllum fyrri keyrslum, hverri um sig, (8. heimild). Nothæfir lokastyrkleikar eru 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 og 200 µg/ml. Hámarkslokastyrkur er 200 µg/ml. Ef í ljós kemur jákvætt gildi fyrir CD86 við 1 µg/ml er gildið 0,1 µg/ml metið til að finna styrk prófunaríðefnisins sem kallar ekki fram CD86 yfir jákvæðu viðmiðunarmörkunum. Fyrir hverja keyrslu er EC150 (styrkur þar sem íðefni nær jákvæðu

CD86-viðmiðunarmörkunum 150%, sjá 19. lið) reiknað út ef jákvæð styrkháð CD86-svörun kemur fram. Ef prófunaríðefnið kallar fram jákvæða CD86-svörun, sem er ekki styrkháð, skiptir útreikningur á EC150 e.t.v. ekki máli eins og lýst er í U-SENS™ aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 183 (12. heimild). Fyrir hverja keyrslu er CV70 (styrkur þar sem íðefni nær frumueiturhrifaviðmiðunarmörkunum 70%, sjá 19. lið) reiknað út þegar unnt er (12. heimild). Til að rannsaka áhrif styrkháðrar svörunar við aukningu hjá CD86 skulu allir styrkleikar, sem eru valdir úr nothæfum styrkleikum, dreifast sem jafnast milli EC150 (eða hæsta CD86-neikvæða styrkleika sem er ekki frumueitrandi) og CV70 (eða hæsta styrkleika sem er leyfður, þ.e. 200 µg/ml). Prófa skal a.m.k. fjóra styrkleika í hverri keyrslu þar sem a.m.k. tveir styrkleikar eru þeir sömu og í fyrri keyrslu(m) til samanburðar.

15. Samanburður með leysi/burðarefni, sem er notaður í U-SENS™-prófuninni, er tilbúið æti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í tilbúnu æti) (sjá 4. lið) eða 4% dímetýlsúlfoxíð í tilbúnu æti (fyrir prófunaríðefni sem eru uppleyst í eða stöðug dreifilausn í dímetýlsúlfoxíði).

16. Jákvæður samanburður, sem er notaður í U-SENS™-prófuninni, er trínítróbensensúlfónsýra (sjá 11. lið) sem er tilreidd í tilbúnu æti. Nota skal trínítróbensensúlfónsýru sem jákvæðan samanburð fyrir mælingu á tjáningu CD86 með einum lokastyrkleika í bakka (50 µg/ml) sem gefur > 70% lífvænleika frumna. Til að fá styrkleikann 50 µg/ml af trínítróbensensúlfónsýru í bakka er tilreidd 1 M (þ.e. 293 mg/ml) stofnlausn af trínítróbensensúlfónsýru í tilbúnu æti og þynnt enn frekar, 2930-falt með tilbúnu æti, í vinnulausn sem nemur 100 µg/ml. Nota skal mjólkursýru (CAS-númer 50-21-5) sem neikvæðan samanburð með 200 µg/ml, uppleyst í tilbúnu æti (úr 0,4 mg/ml stofnlausn). Í hvern bakka fyrir hverja keyrslu eru tilreiddar þrjár samhliða prófanir með ómeðhöndluðum samanburði með tilbúnu æti, samanburður með leysi/burðarefni, neikvæður samanburður og jákvæður samanburður (12. heimild). Nota má aðra heppilega jákvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur. Viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur eru þær sömu og lýst er fyrir prófunaríðefnið (sjá 12. lið).

Notkun prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Samanburður með leysi/burðarefni eða vinnulausnirnar, sem lýst er í 14.–16. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusviflausnum sem eru tilreiddar í 96 holu bakka með flatri botnplötu (sjá 12. lið). Meðhöndluðu bakkarnir eru síðan settir í ræktun í 45±3 klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO_2). Fyrir ræktun er bökkunum þéttlokað með hálfgegndræpri himnu til að komast hjá því að rokgjörn prófunaríðefni gufi upp og komast hjá víxlmengun milli frumna sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefnum (12. heimild).

Frumulitun

18. Eftir váhrif í 45±3 klst. eru frumurnar færðar yfir í V-laga míkrótítrunarbakka og safnað með skiljun. Leysnitruflun er skilgreind sem kristallar eða dropar sem sjást í smásjá 45±3 klst. eftir meðhöndlun (fyrir frumulitunina). Flotinu er fleygt og frumurnar sem eftir eru eru þvegnar einu sinni með 100 µl af ískaldri fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur 5% af kálfsfóstursermi (litunarjafnalausn). Eftir skiljun eru frumurnar enduruppleystar með 100 µl af litunarjafnalausn og litaðar með 5 µl (t.d. 0,25 µg) af FITC-merktum mótefnum af tegundinni and-CD86 eða IgG1 (flokkur) úr músum við 4 °C í 30 mín, varið ljósi. Nota skal mótefnin sem lýst er í U-SENS™ aðferðarlýsingu DB-ALM nr. 183 (12. heimild) (fyrir CD86: BD-PharMingen #5556 57 klón: Fun-1 eða Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klón: BU63 og fyrir IgG1: BD-PharMingen #5557 48 eða Caltag/Invitrogen # GM4992). Á grundvelli reynslu hönnuða prófunarinnar er flúrljómunarstyrkur mótefnanna yfirleitt svipaður milli mismunandi lota. Nota má mótefni af öðrum klónum eða frá öðrum birgjum, sem stóðust athuganir á virkni, í prófunina (sjá 11. lið). Þó geta notendur íhugað að títra mótefnin við eigin rannsóknarstofuskilyrði til að skilgreina besta styrkleikann til að nota. Nota má önnur greinikerfi, t.d. flúrskinsmerkt

and-CD86 mótefni, ef hægt er að sýna fram á að þau gefi svipaðar niðurstöður og tilsvarandi mótefni ísóþíósýanats í flúrskinslausn, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 2.2. Eftir tvo þvotta með 100 µl af litunarjafnalausn og einn með 100 µl af ískaldri fosfatstilltri saltlausn eru frumurnar enduruppleystar í ískaldri fosfatstilltri saltlausn (t.d. 125 µl fyrir sýni sem eru greind handvirkt, tilraunaglas fyrir tilraunaglas, eða 50 µl fyrir notkun á sjálfvirkum sýnatökubakka) og própidíumjoðíðlausn bætt við (lokastyrkur 3 µg/ml). Nota má aðra frumueiturhrifamarka, s.s. 7-amínóaktínómýsín-D (7-AAD) eða trypan-bláan, ef hægt er að sýna fram á að staðgöngulitir gefi svipaðar niðurstöður og própidíumjoðíð, t.d. með því að prófa hæfnisefnin í viðbæti 1.2.

Frumuflæðissjárgreining

19. Gildi tjáningar fyrir CD86 og lífvænleika frumna eru greind með frumuflæðissjárgreiningu. Frumurnar eru sýndar á punktalínuriti, sem er stillt á lograkvarða, eftir stærð (FSC) og kornagerð (SSC) til að greina með skýrum hætti hóp við fyrstu afmörkun (e. *first gate*) R1 og fjarlægja leifarnar. Samtals 10 000 frumna í afmörkun R1 er aflað fyrir hverja holu. Frumur úr sömu R1-afmörkuninni eru sýndar á FL3- eða FL4-/SSC-punktalínuriti. Lífvænlegar frumur eru teiknaðar upp með því að koma fyrir annarri afmörkun, R2, sem velur hóp própidíumjoðíðneikvæðra frumna (FL3- eða FL4-rás). Hægt er að reikna lífvænleika frumna út með eftirfarandi jöfnu í greiningarforriti frumumælisins. Ef lífvænleiki frumna er lítill er hægt að afla allt að 20 000 frumna, þ.m.t. dauðar frumur. Að öðrum kosti er hægt að afla gagna í eina mínútu eftir að greiningin hefst.

$$Lífvænleiki\ frumna = \frac{Fjöldi\ lifandi\ frumna}{Heildarfjöldi\ frumna\ sem\ er\ aflað} \times 100$$

Hundraðshluti FL1-jákvæðra frumna er síðan mældur í hópi þessara lífvænlegu frumna sem afmarkast við R2 (innan R1). Tjáning frumuyfirborðs CD86 er greind á FL1-/SSC-punktalínuriti sem afmarkast við lífvænlegar frumur (R2).

Að því er varðar holur með tilbúnu æti/IgG1 er greiningarmarkinn settur nálægt aðalhópnum þannig að IgG1 í samanburðinum með tilbúna ætinu liggi innan við marksvæðið 0,6 til 0,9%.

Litatruflun er skilgreind sem hliðrun FITC-merktra IgG1 í punktalínuritinu (IgG1 FL1 faldmeðaltal örvunarstuðulsins (S.I.) ≥ 150%).

Örvunarstuðull (S.I.) CD86 fyrir samanburðarfrumur (ómeðhöndlaðar eða í 0,4% dímetýlsúlfoxíði) og íðefnameðhöndlaðar frumur er reiknaður út með eftirfarandi jöfnu:

$$Örvunarstuðull\ (S.I.) = \frac{\%\ af\ CD86^{+}meðhöndlaðar\ frumur - \%\ af\ IgG1^{+}meðhöndlaðar\ frumur}{\%\ af\ CD86^{+}samanburðarfrumur - \%\ af\ IgG1^{+}samanburðarfrumur} \times 100$$

% af ómeðhöndluðum IgG1^{+} samanburðarfrumum: vísað er til þeirra sem hundraðshluta FL1-jákvæðra IgG1-frumna, skilgreindar með greiningarmarkanum (samþykkt styrkbil sem nemur ≥ 0,6% og < 1,5%, sjá 22. lið), í hópi lífvænlegra ómeðhöndlaðra frumna.

% af samanburðarfrumum/meðhöndluðum frumum IgG1^{+}/CD86^{+}: vísað er til þeirra sem hundraðshluta FL1-jákvæðra IgG1-/CD86-frumna sem eru mældar án þess að færa greiningarmarkann til í hópi lífvænlegra samanburðarfrumna/ meðhöndlaðra frumna.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

20. Eftirfarandi breytur eru reiknaðar út í U-SENS™-prófuninni: Gildi CV70, þ.e. styrkur sem sýnir 70% af lifun U937-frumna (30% frumueiturhrif) og EC150-gildi, þ.e. styrkur þar sem prófunaríðefnin framkalla örvunarstuðul (S.I.) CD86 sem nemur 150%.

CV70 er reiknað út með logralínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

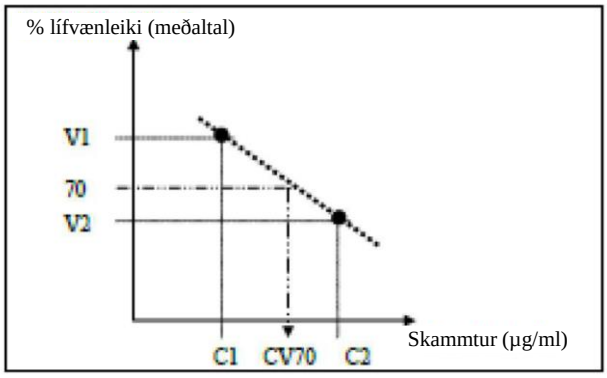
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Þar sem:

V1 er lágmarksgildi lífvænleika frumna yfir 70%

V2 er hámarksgildi lífvænleika frumna undir 70%

C1 og C2 eru styrkleikar sem sýna gildi lífvænleika frumna V1 og V2, eftir því sem við á



Hægt er að nota aðrar aðferðir til að fá fram CV70 svo fremi að sýnt sé fram á að það hafi engin áhrif á niðurstöðurnar (t.d. með því að prófa hæfnisefnin).

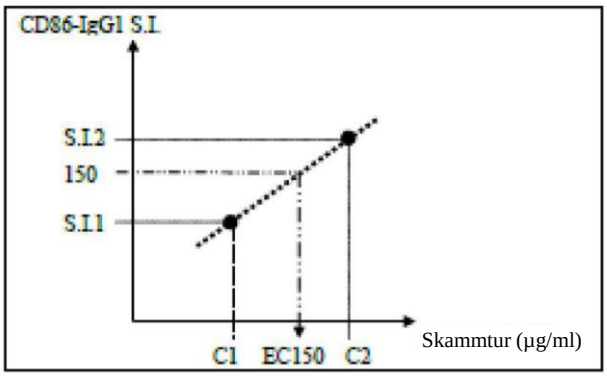
EC150 er reiknað út með logralínulegum innreikningi með eftirfarandi jöfnu:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Þar sem:

C1 er hæsti styrkur í µg/ml með örvunarstuðul (S.I.) CD86 < 150% (S.I. 1)

C2 er lægsti styrkur í µg/ml með örvunarstuðul (S.I.) CD86 ≥ 150% (S.I. 2).



Gildi EC150 og CV70 eru reiknuð út

— fyrir hverja keyrslu: einstök gildi EC150 og CV70 eru notuð sem verkfæri til að rannsaka áhrif styrkháðrar svörunar við aukningu hjá CD86 (sjá 14. lið),

— CV70 í heildina er ákvarðað á grundvelli lífvænleikameðaltals (12. heimild),

— EC150 í heildina er ákvarðað fyrir prófunaríðefni, sem spáð er að sé JÁKVÆTT með U-SENS™-prófuninni (sjá 21. lið) (12. heimild), á grundvelli meðaltals örvunarstuðulsins (S.I.) fyrir CD86-gildin.

Spálíkan

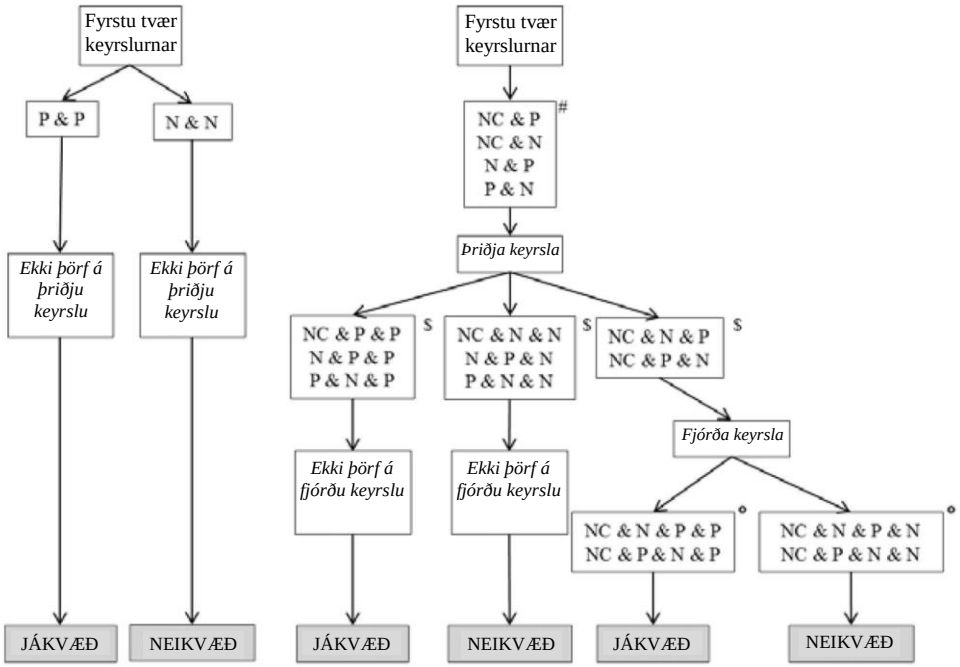
21. Að því er varðar mælingu á tjáningu CD86 er hvert prófunaríðefni prófað í a.m.k. fjórum styrkleikum og í a.m.k. tveimur sjálfstæðum keyrslum (gerðar á mismunandi degi) til að leiða út eina spá (JÁKVÆÐA eða NEIKVÆÐA).

— Niðurstaða úr hverri keyrslu U-SENS™-prófunar fyrir sig telst vera neikvæð (hér á eftir nefnd „N“) ef örvunarstuðull (S.I.) CD86 er lægri en 150% í öllum styrkleikum sem eru ekki frumueitrandi (lífvænleiki frumna ≥ 70%) og ef engin truflun kemur fram (frumueiturhrif, leysni: sjá 18. lið eða litur: sjá 19. lið, óháð styrkleikum, sem eru ekki frumueitrandi, þar sem truflunin kemur fram). Í öllum öðrum tilvikum: ef örvunarstuðull (S.I.) CD86 er hærri en eða jafn og 150% og/eða ef truflanir koma fram telst niðurstaða úr hverri keyrslu U-SENS™-prófunar fyrir sig vera jákvæð (hér á eftir nefnd „P“).

— Spá með U-SENS™-prófun er talin NEIKVÆÐ ef a.m.k. tvær sjálfstæðar keyrslur eru neikvæðar (N) (mynd 1). Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar neikvæðar (N) telst spáin með U-SENS™-prófuninni NEIKVÆÐ og það þarf ekki að framkvæma þriðju keyrsluna.

— Spá með U-SENS™-prófun er talin JÁKVÆÐ ef a.m.k. tvær sjálfstæðar keyrslur eru jákvæðar (P) (mynd 1). Ef fyrstu tvær keyrslurnar eru báðar jákvæðar (P) telst spáin með U-SENS™-prófuninni JÁKVÆÐ og það þarf ekki að framkvæma þriðju keyrsluna.

— Sökum þess að skammtaákvörðunargreining er ekki framkvæmd gildir undantekning ef örvunarstuðull (S.I.) fyrir CD86, í fyrstu keyrslunni, er hærri en eða jafn og 150% við einungis hæsta styrkleikann sem er ekki frumueitrandi. Þá telst keyrslan EKKI AFGERANDI (NC) og prófa skal viðbótarstyrkleika (á milli hæsta styrks sem hefur ekki frumueiturhrif og lægsta styrks sem hefur frumueiturhrif - sjá 20. lið) í viðbótarkeyrslum. Ef keyrsla reynist vera NC skal keyra a.m.k. 2 viðbótarkeyrslur og fjórðu keyrslu ef keyrsla 2 og keyrsla 3 eru ekki samsvarandi (N og/eða P óháð hvor annarri) (mynd 1). Eftirfylgnikeyrslur teljast jákvæðar þó að einungis einn styrkleiki, sem er ekki frumueitrandi, gefi CD86 sem er jafnt og eða meira en 150% af því að ákvörðun á styrkleikunum hefur verið aðlöguð fyrir þetta tiltekna prófunaríðefni. Endanleg spá verður byggð á niðurstöðu úr meirihluta keyrslnanna þriggja eða fjögurra, hverri um sig, (þ.e. 2 af 3 eða 2 af 4) (mynd 1).



Mynd 1 Spálíkan sem er notað í U-SENS™-prófuninni. U-SENS™-spá skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 4. liðar og 7., 8. og 9. liðar í almenna inngangsinum.

N: Keyrsla án jákvæðrar CD86-niðurstöðu eða truflun kom fram.

P: Keyrsla með jákvæðri CD86-niðurstöðu og/eða truflun/truflanir kom(u) fram.

NC: Ekki afgerandi. Fyrsta keyrsla með „Ekki afgerandi“ þegar CD86 er einungis jákvætt við hæsta styrk sem er ekki frumueitrandi.

#: Ein niðurstaða með „Ekki afgerandi“ (NC), sem kemur einungis fram í fyrstu keyrslunni, hefur sjálfkrafa í för með sér að þörf verður á þriðju keyrslunni til að ná meirihluta jákvæðra (P) eða neikvæðra (N) niðurstaðna í a.m.k. 2 af 3 sjálfstæðum keyrslum.

$: Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr þremur keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust í fyrstu tveimur keyrslunum sem koma fram í reitnum hér að framan.

º: Reitirnir sýna viðeigandi samsetningu niðurstaðna úr fjórum keyrslum á grundvelli niðurstaðna sem fengust í fyrstu þremur keyrslunum sem koma fram í reitnum hér að framan.

Samþykktarviðmiðanir

22. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar U-SENS™-prófun er notuð (12. heimild).

— Við lok 45±3 klst. váhrifatímabils verður meðaltal lífvænleika í þremur samhliða prófunum með ómeðhöndluðum U937-frumum að vera > 90% og ekkert rek í tjáningu CD86 kemur fram. Grunntjáning CD86 í ómeðhöndluðum U937-frumum verður að hafa legið á bilinu 2% og ≤ 25%.

— Þegar dímetýlsúlfoxíð er notað sem leysir er gildi samanburðar með dímetýlsúlfoxíði/burðarefni metið með því að reikna út örvunarstuðul (S.I.) dímetýlsúlfoxíðs samanborið við ómeðhöndlaðar frumur og meðaltal lífvænleika frumnanna í þremur samhliða prófunum með frumum verður að vera > 90%. Samanburður með dímetýlsúlfoxíði/burðarefni er gildur ef meðalgildið fyrir örvunarstuðul (S.I.) CD86 í samhliða prófununum þremur var lægra en 250% af meðalgildinu fyrir örvunarstuðul (S.I.) CD86 í samhliða prófununum þremur með ómeðhöndluðum U937-frumum.

— Keyrslurnar teljast gildar ef a.m.k. tvö af þremur IgG1-gildum ómeðhöndlaðra U937-frumna falla innan styrkbilsins ≥ 0,6% og < 1,5%.

— Neikvæður samanburður sem er prófaður samskeiða (mjólkursýra) telst gildur ef a.m.k. tvær af þremur samhliða prófunum voru neikvæðar (örvunarstuðull (S.I.) CD86 < 150%) og ekki frumueitrandi (lífvænleiki frumna ≥ 70%).

— Jákvæður samanburður (trínítróbensensúlfónsýra) taldist gildur ef a.m.k. tvær af þremur samhliða prófunum voru jákvæðar (örvunarstuðull (S.I.) CD86 ≥ 150%) og ekki frumueitrandi (lífvænleiki frumna ≥ 70%).

Prófunarskýrsla

23. 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, leysni í tilbúnu æti, 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.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda:

— Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), að því marki sem unnt er.

— Útlit, leysni í tilbúnu æti, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd 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.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Samanburður

Jákvæður samanburður

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, 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.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

Neikvæður samanburður og samanburður með leysi/burðarefni

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla 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 samanburðir með leysi/öðrum burðarefnum eru notuð en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir og að því marki sem unnt er.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni.

Prófunarskilyrði

— Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

— Lýsing á prófuninni sem er notuð.

— Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).

— Frumuflæðissjárgreining sem er notuð (t.d. líkan), þ.m.t. stillingar á tæki, mótefni og frumueiturhrifamarkar sem eru notaðir.

— Verklag sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunina með því að prófa hæfnisefnin og verklag sem er notað til að sýna fram á að samanburðarnákvæmni prófunarinnar sé viðhaldið yfir lengri tíma, t.d. rannsóknarsöguleg samanburðargögn og/eða söguleg gögn um athuganir á virkni.

Viðmiðanir fyrir samþykkt prófunar

— Lífvænleiki frumna og gildi örvunarstuðuls (S.I.) CD86, sem fást með samanburði með leysi/burðarefni, í samanburði við ásættanleikasviðin.

— Lífvænleiki frumna og gildi örvunarstuðuls (S.I.), sem fást með jákvæðum samanburði, í samanburði við ásættanleikasviðin.

— Lífvænleiki frumna í öllum prófuðum styrkleikum prófaða íðefnisins.

Prófunaraðferð

— Fjöldi keyrslna sem er notaður.

— Styrkur prófunaríðefna, íbæting og váhrifatími sem eru notuð (ef frábrugðið því sem mælt er með).

— Tími sem váhrif standa yfir.

— Lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.

— Lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

Niðurstöður

— Töflusetning gagnanna, þ.m.t. CV70 (ef við á), örvunarstuðull (S.I.), gildi fyrir lífvænleika frumna, gildi fyrir EC150 (ef við á), sem fást fyrir prófunaríðefnið og fyrir jákvæða samanburðinn í hverri keyrslu, og upplýsingar um flokkun prófunaríðefnis samkvæmt spálíkaninu.

— Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

— Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með U-SENS™-prófuninni.

— Athugun á niðurstöðum prófunarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

Ályktanir

HEIMILDIR

1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Aðgengilegt á: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/8157 37.Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/5889 55. Aðgengilegt á: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

10) 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, 1 683-1 696.

11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33 bls. Aðgengilegt á: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Aðgengilegt á: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06. %20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Viðbætir 2.1

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófun (14. 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* (15. heimild).

S**tyrkháð svörun CD86:** Um er að ræða styrkhæði (eða styrkháða svörun) þegar jákvæðum styrk (örvunarstuðull (S.I.) CD86 ≥ 150) er fylgt eftir með styrk með hækkandi örvunarstuðli (S.I.) CD86.

Íðefni: Efni eða blanda.

CV70: Áætlaður styrkur sem sýnir 70% lífvænleika frumna.

Rek: Rek er skilgreint með i. leiðrétt %CD86^{+}-gildi í ómeðhöndluðum samhliða samanburði 3 er lægra en 50% af meðaltali leiðrétts %CD86^{+}-gildis í ómeðhöndluðum samhliða samanburðum 1 og 2 og ii. leiðrétt %CD86^{+}-gildi í neikvæðum samhliða samanburði 3 er minna en 50% af meðaltali leiðrétts %CD86^{+}-gildis í neikvæðum samhliða samanburðum 1 og 2.

EC150: áætlaður styrkur sem sýnir 150% af örvunarstuðli (S.I.) tjáningar CD86.

Frumuflæðissjárgreining: frumumælingartækni þar sem frumur, sem eru leystar upp í vökva, flæða ein í einu gegnum brennipunkt segulmögnunarljósgeisla (e. *focus of exciting light*) sem dreifist í mynstri sem er einkennandi fyrir frumurnar og hluta þeirra; frumurnar eru oft merktar með flúrmerkiefnum þannig að fyrst er ljósið ísogað en síðan sent út á annarri tíðni.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur 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

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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: 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.

Ólífrænt umbreyttir meðvakar: íðefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera, t.d. með oxun.

Lífrænt umbreyttir meðvakar: íðefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

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) prófunar (14. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðar-nákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (14. heimild).

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (14. heimild).

S.I.: Örvunarstuðull. Hlutfallsleg gildi faldmeðaltals flúrljómunarstyrks (MFI) í íðefnameðhöndluðum frumum samanborið við leysismeðhöndlaðar frumur.

Samanburður með leysi/burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (14. heimild).

Litunarjafnalausn: Fosfatstillt saltlausn sem inniheldur 5% af kálfsfóstursermi.

Efni: Frumefni og efnasambönd þess, náttúruleg eða unnin með framleiðsluferlum, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika þess, og öll óhreinindi, sem stafa frá vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófun.

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. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (16. heimild).

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófun: Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (14. heimild).

Viðbætir 2.2

HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, 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 U-SENS™-prófuninni fyrir hæfnisefnin 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram CV70- og EC150-gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 10. Hæfnisefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin eru fáanleg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir *í lífi*, sem og um rannsóknir *í glasi* sem verða til með U-SENS™-prófuninni, eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir U-SENS™-prófunina (1. og 8. heimild).

Tafla 1

Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni í tengslum við U-SENS™-prófunina

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá *í lífi* (1)	U-SENS™ leysir/burðarefni	U-SENS™ CV70-viðmiðunarbil í µg/ml (2)	U-SENS™ EC150-viðmiðunarbil í µg/ml (2)
4-fenýlendíamín	106-50-3	Fast efni	Næmir (sterkur)	Tilbúið æti (3)	<30	Jákvætt (≤10)
Píkrýlsúlfónsýra	2508-19-2	Vökvi	Næmir (sterkur)	Tilbúið æti	>50	Jákvætt (≤50)
Díetýlmaleat	141-05-9	Vökvi	Næmir (meðalsterkur)	Dímetýlsúlfoxíð	10–100	Jákvætt (≤20)
Resorsínól	108-46-3	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	Tilbúið æti	>100	Jákvætt (≤50)
Sinnamínalkóhól	104-54-1	Fast efni	Næmir (vægur)	Dímetýlsúlfoxíð	>100	Jákvætt (10–100)
4-allýlanísól	140-67-0	Vökvi	Næmir (vægur)	Dímetýlsúlfoxíð	>100	Jákvætt (<200)
Sakkarín	81-07-2	Fast efni	Ekki næmir	Dímetýlsúlfoxíð	>200	Neikvætt (>200)
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Ekki næmir	Tilbúið æti	>200	Neikvætt (>200)
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	Tilbúið æti	>200	Neikvætt (>200)
Salisýlsýra	69-72-7	Fast efni	Ekki næmir	Dímetýlsúlfoxíð	>200	Neikvætt (>200)

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

(1) Spár um hættu *í lífi* og (mátt) byggjast á eitlagreiningargögnum (1. og 8. heimild). Máttur *í lífi* er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumiðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (17. heimild).

(2) Byggt á sögulegum mældum gildum (1. og 8. heimild).

(3) Tilbúið æti: RPMI-1640-æti með viðbættu 10% kálfsfóstursermi, 2 mM L-glútamíni, 100 einingar/ml penisillíni og 100 µg/ml streptómýsíni (8. heimild).

3. viðbætir

HÚÐNÆMING Í GLASI: IL-8 LUC-GREINING

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

1. Öfugt við greiningar sem greina tjáningu frumuyfirborðsmarka magngreinir IL-8 Luc-greiningin breytingar á tjáningu IL-8, frumuboða sem tengist virkjun angafruma. Í frumulínu, sem er fengin frá THP-1, með vísigenið IL-8 (THP-G8, úr THP-1 línu einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum) er tjáning IL-8 mæld eftir váhrif frá næmandi efnum (1. heimild). Tjáning lúsíferasans er síðan notuð til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi.

2. IL-8 Luc-greiningin var metin í fullgildingarrannsókn (2. heimild) sem „Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods“ (miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguaðferða) (JaCVAM), „**Ministry of Economy, Trade and Industry**“ (Efnahags-, viðskipta- og iðnaðarráðuneytið) (METI) og „Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments**“ (japönsk samtök um annars konar aðferðir en tilraunir á dýrum **(JSAAE**) inntu af hendi og síðan fór fram óháð jafningjarýni (3. heimild) á vegum „Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods“ (JaCVAM) og „Ministry of Health, Labour and Welfare“ (Heilbrigðis-, atvinnu- og velferðarráðuneytið) (MHLW) með stuðningi „**International Cooperation on Alternative Test** Methods“ (alþjóðleg samvinna um annars konar prófunaraðferðir) (ICATM). Að teknu tilliti til allra fyrirliggjandi sannana og innleggs frá eftirlitsaðilum og hagsmunaaðilum telst IL-8 Luc-greiningin gagnleg sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings til að skilja á milli næmandi efna og efna sem eru ekki næmandi til hættuflokkunar og merkinga. Dæmi um notkun á gögnum úr IL-8 Luc-greiningu í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (4.–6. heimild).

3. Í ljós kom að IL-8 Luc-greiningin reyndist yfirfæranleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktun og lúsíferasamælingum. Samanburðarnákvæmni innan og milli rannsóknarstofa var 87,7% og 87,5%, eftir því sem við á (2. heimild). Gögn sem var aflað í fullgildingarrannsókninni (2. heimild) og önnur útgefin verk (1. og 6. heimild) sýna að öfugt við eitlagreiningu mat IL-8 Luc-greiningin 118 af 143 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 25 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni IL-8 Luc-greiningarinnar við að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki næmandi (þ.e. utan flokks í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) er 86% (101/118) með 96% næmi (92/96) og 41% sértæki (9/22). Að undanskildum efnum sem eru utan notkunarsviðsins sem lýst er hér á eftir (5. liður) mat IL-8 Luc-greiningin 113 af 136 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 23 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmni IL-8 Luc-greiningarinnar er 89% (101/113) með 96% næmi (92/96) og 53% sértæki (9/17). Með því að nota gögn um menn, sem um getur í Urbisch o.fl. (7. heimild), mat IL-8 Luc-greiningin 76 af 90 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 14 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmnin er 80% (61/76) með 93% næmi (54/58) og 39% sértæki (7/18). Að undanskildum efnum sem eru utan notkunarsviðsins mat IL-8 Luc-greiningin 71 af 84 íðefnum sem jákvæð eða neikvæð og mat 13 íðefni sem ekki afgerandi og nákvæmnin er 86% (61/71) með 93% næmi (54/58) og 54% sértæki (7/13). Falsneikvæðar spár með IL-8 Luc-greiningunni eru líklegri til að eiga sér stað varðandi íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt/húðnæmingarmátt í meðallagi (undirundirflokkur 1B í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en varðandi þau sem sýna mikinn mátt (undirundirflokkur 1A í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (6. heimild). Til samans styðja upplýsingarnar hlutverk IL-8 Luc-greiningarinnar við að greina áhættu á húðnæmingu. Nákvæmnin sem gefin er fyrir IL-8 Luc-greininguna sem sjálfstætt próf er einungis leiðbeinandi þar eð líta skal á prófið í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 7. og 8. liðar í almenna innganginum. Þegar aðferðir, án prófana á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar skal enn fremur hafa í huga að eitlagreining og aðrar prófanir á dýrum endurspegla e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá mönnum.

4. Á grundvelli gagna sem nú liggja fyrir reyndist IL-8 Luc-greiningin nothæf til að prófa íðefni sem búa yfir ýmsum lífrænum virkum hópum, hvarfgöngum, húðnæmingarmætti (sem hefur verið ákvarðaður með rannsóknum *í lífi*) og eðlisefnafræðilegum eiginleikum (2. og 6. heimild).

5. Jafnvel þótt X-VIVO™ 15 væri notað sem leysir í IL-8 Luc-greiningunni mat það rétt íðefni með Log K_{ow} >3,5 og þau sem eru með vatnsleysni sem nemur u.þ.b. 100 µg/ ml, eins og það er reiknað út með EPI Suite™, og nothæfi þess til að greina næmandi efni sem eru torleysanleg í vatni er betri en með því að nota dímetýlsúlfoxíð sem leysi (2. heimild) í IL-8 Luc-greiningunni. Þó geta neikvæðar niðurstöður fyrir prófunaríðefni, sem eru ekki uppleyst við 20 mg/ml, framkallað falsneikvæðar niðurstöður vegna þess að þau geta ekki leystst upp í X-VIVO™ 15. Þess vegna skal ekki taka tillit til neikvæðra niðurstaðna fyrir þessi íðefni. Í fullgildingarrannsókninni kom í ljós hátt hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna fyrir anhýdríð. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumulínunnar (8. heimild) og tilraunaskilyrðanna geta lífrænt umbreyttir meðvakar (efni sem þurfa efnaskiptavirkjun) og ólífrænt umbreyttir meðvakar (efni sem virkjast með loftoxun) enn fremur gefið neikvæðar niðurstöður í greiningunni. Jafnvel þótt túlka skuli neikvæðar niðurstöður varðandi grun um ólífrænt/lífrænt umbreytta meðvaka með fyrirvara mat IL-8 Luc-greiningin þó 11 af 11 ólífrænt umbreyttum meðvökum, 6/6 af lífrænt umbreyttum meðvökum og 6/8 af ólífrænt/lífrænt umbreyttum meðvökum á réttan hátt í gagnamengi IL-8 Luc-greiningarinnar. Á grundvelli nýlegrar heildarúttektar á þremur prófunum án dýra (Bein prófun á hvarfgirni við peptíð (DPRA), KeratinoSens™ og h-CLAT-prófun) til að greina ólífrænt og lífrænt umbreytta meðvaka (9. heimild) og á grundvelli þeirrar staðreyndar að THP-G8-frumur, sem eru notaðar í IL-8 Luc-greiningunni, eru frumulína, sem er fengin frá THP-1, sem er notuð í h-CLAT-prófuninni getur IL-8 Luc-greiningin einnig stuðlað að því að auka næmi prófana án dýra að því er varðar að greina ólífrænt og lífrænt umbreytta meðvaka í samsetningu með öðrum prófunum. Yfirborðsvirk efni, sem hafa verið prófuð fram að þessu, gáfu (fals)jákvæðar niðurstöður óháð tegund (t.d. plúshlaðið, mínushlaðið eða ójónað). Að lokum geta íðefni, sem trufla lúsíferasa, ruglað virkni/mælingar á efninu, valdið greinilegri hömlun eða aukið ljómun (10. heimild). Til dæmis var greint frá því að plöntuestrógenstyrkur yfir 1 µM hefði áhrif á ljómunarmerki í öðrum lúsíferasamiðuðum vísigensprófum vegna ofvirkjunar á vísigeni lúsíferasans. Af þessum sökum þarf að rannsaka lúsíferasatjáningu, sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða samsettra efna sem grunur leikur á um að myndi plöntuestrógenlíka virkjun á vísigeni lúsíferasa, vandlega (11. heimild). Á grundvelli framangreinds eru yfirborðsvirk efni, anhýdríð og íðefni sem trufla lúsíferasa utan notkunarsviðs þessa prófs. Í tilvikum þar sem um er að ræða sannanir sem sýna fram á að IL-8 Luc-prófið sé ónothæft fyrir aðra tiltekna flokka prófunaríðefna skal ekki nota prófið fyrir þessa tilteknu flokka.

6. Eins og lýst er hér að framan er IL-8 Luc-prófið til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki næmandi. Þörf er á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr IL-8 Luc-prófi geta stuðlað að því að meta mátt þegar litið er á þær í samsetningu með öðrum upplýsingaveitum.

7. Skilgreiningar eru gefnar í viðbæti 3.1.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

8. Í IL-8 Luc-prófinu er notuð lína einkjörnungahvítblæðisfrumna úr mönnum, THP-1, sem var fengin frá American Type Culture Collection (Manassas, VA, Bandaríkin). Með notkun á þessari frumulínu ákvarðaði húðsjúkdómafræðideild læknadeildar háskólans í Tohoku (Tohoku University School of Medicine) frumulínu, sem er fengin frá THP-1, með vísigenið IL-8, THP-G8, sem hýsir lúsíferasagenin SLO (*Stable Luciferase Orange*) og SLR (*Stable Luciferase Red*) undir stjórn IL-8- og GAPDH- (glýseraldehýð-3-fosfatvetnissviptis) stýrla, eftir því sem við á (1. heimild). Þetta gerir það kleift að gera megindlegar mælingar á vakningu lúsíferasagena með því að greina ljómun frá vel þekktum ljósgefandi lúsíferasahvarfefnum sem mælikvarða á virkni IL-8 og GAPDH í frumum eftir váhrif frá næmandi íðefnum.

9. Prófunarkerfi með tveimur litum samanstendur af lúsíferasa sem gefur frá sér appelsínugulan lit (SLO; hámark = 580 nm) (12, heimild) fyrir genatjáningu IL-8-stýrilsins, sem og lúsíferasa sem gefur frá sér rauðan lit (SLR; hámark = 630 nm) (13. heimild) fyrir genatjáningu stýrils innri stjórnunar, GAPDH. Lúsíferasarnir tveir gefa frá sér mismunandi liti þegar þeir hvarfast við d-lúsíerín úr eldflugum og ljómun þeirra er mæld samtímis í eins þreps efnahvarfi með því að skipta útgeisluninni frá prófunarblöndunni með ljóssíu (14. heimild) (viðbætir 3.2).

10. THP-G8-frumur eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu í 16 klst. og eftir það er virkni SLO-lúsíferasans (SLO-LA), sem endurspeglar virkni IL-8-stýrilsins, og virkni SLR-lúsíferasans (SLR-LA), sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrilsins, mæld. Til að auðveldara verði að skilja skammstafanirnar eru virkni SLO-lúsíferasans og virkni SLR-lúsíferasans nefndar IL8LA og GAPLA, eftir því sem við á. Í töflu 1 er lýsing á hugtökum sem tengjast lúsíferasavirkni í IL-8 Luc-prófinu. Mæld gildi eru notuð til að reikna út staðlað IL8LA (nIL8LA) sem er hlutfallið milli IL8LA og GAPLA; örvun nIL8LA (Ind-IL8LA) sem er hlutfall meðaltals fjórmældra gilda nIL8LA í THP-G8-frumum, sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefni, og gildi nIL8LA í ómeðhöndluðum THP-G8-frumum; og hömlun GAPLA (Inh-GAPLA) sem er hlutfall meðaltals fjórmældra gilda GAPLA í THP-G8-frumum, sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefni, og gildi GAPLA í ómeðhöndluðum THP-G8-frumum, og notuð sem vísir um frumueiturhrif.

Tafla 1

Lýsing á hugtökum sem tengjast lúsíferasavirkni í IL-8 Luc-prófinu

Skammstafanir	Skilgreining
GAPLA	Virkni SLR-lúsíferasa sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrils
IL8LA	Virkni SLO-lúsíferasa sem endurspeglar virkni IL-8-stýrils
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA fyrir THP-G8-frumur sem eru meðhöndlaðar með íðefnum/nIL8LA fyrir ómeðhöndlaðar frumur
Inh-GAPLA	GAPLA í THP-G8-frumum sem eru meðhöndlaðar með íðefnum/ GAPLA í ómeðhöndluðum frumum
CV05	Lægsti styrkur íðefnis þar sem Inh-GAPLA verður < 0,05.

11. Nothæfisstaðlar (15. heimild) eru fáanlegir til að auðvelda fullgildingu á breyttum IL-8-lúsíferasaprófum *í glasi*, sem eru svipuð og IL-8 Luc prófið, og gefa færi á tímanlegum breytingum á OECD-viðmiðunarreglu 442E um prófanir til að fella þau inn. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna samkvæmt Efnahags- og framfarastofnuninni fyrir prófanir sem eru fullgiltar samkvæmt nothæfisstöðlunum ef þessar prófanir hafa verið endurskoðaðar og Efnahags- og framfarastofnunin fellt þær inn í viðmiðunarreglu 442E um prófanir (16. heimild).

SÝNT FRAM Á HÆFNI

12. Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðauka við prófunaraðferð B.71., er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10, sem eru tilgreind í viðbæti 3.3, í samræmi við góðar starfsvenjur við aðferðir *í glasi* (17. heimild). Enn fremur skulu notendur prófunarinnar viðhalda sögulegum gagnagrunni yfir gögn sem er aflað með athugunum á virkni (sjá 15. lið) og með jákvæðum samanburðum og samanburðum með leysi/burðarefni (sjá 21.–24. lið) og nota þessi gögn til að staðfesta að samanburðarnákvæmni prófunarinnar á rannsóknarstofu þeirra sé viðhaldið yfir lengri tíma.

VERKFERLI

13. Staðlaðar verklagsreglur fyrir IL-8 Luc-prófið eru fáanlegar og skulu notaðar þegar prófið er framkvæmt (18. heimild). Rannsóknarstofur, sem vilja framkvæma prófunina, geta fengið endurraðaða THP-G8-frumulínu frá GPC Lab. Co. Ltd.,

Tottori, Japan eftir undirritun samnings um yfirfærslu efnis í samræmi við skilyrðin í sniðmáti Efnahags- og framfara-stofnunarinnar. Í eftirfarandi málsgreinum er lýsing á helstu þáttum og tilhögun prófsins.

Undirbúningur frumna

14. Nota skal THP-G8-frumulínuna frá GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan til að framkvæma IL-8 Luc-prófið (sjá 8. og 13. lið). Við móttöku eru frumurnar látnar fjölga sér (2–4 umsáningar) og geymdar frosnar sem einsleitur stofn. Hægt er að láta frumur úr þessum stofni fjölga sér í að hámarki 12 umsáningum eða í 6 vikur hið mesta. Ætið sem er notað til fjölgunar er RPMI-1640-ræktunaræti sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi, lausn sýkladrepandi efnis/sveppalyfs, (100U/ml af penisillíni G, 100µg/ml af streptómýsíni og 0,25µg/ml af amfóterisíni B í 0,85% saltlausn) (t.d. GIBCO Cat#15 240-062), 0,15µg/ml af púrómýsíni (t.d. CAS-númer: 58-58-2) og 300µg/ml G418 (t.d. CAS-númer: 1083 21-42-2).

15. Áður en frumurnar eru notaðar til prófunar skal hæfi þeirra athugað með því að framkvæma athugun á virkni. Þessi athugun skal gerð 1–2 vikum eða 2–4 umsáningum eftir afþíðingu með því að nota jákvæða samanburðinn 4-nítróbensýlbrómíð (4-NBB) (CAS-númer: 100-11-8, ≥ 99% hreinleiki) og neikvæða samanburðinn mjólkursýru (CAS-númer: 50-21-5, ≥85% hreinleiki). 4-nítróbensýlbrómíð á að framkalla jákvæða svörun hjá Ind-IL8LA (≥1.4) en mjólkursýra á að framkalla neikvæða svörun hjá Ind-IL8LA (<1.4). Einungis skal nota þær frumur í prófunina sem stóðust athugun á virkni. Athugunin skal framkvæmd samkvæmt verklaginu sem lýst er í 22.–24. lið.

16. Fyrir prófun er THP-G8-frumum sáð með þéttleika sem nemur 2 til 5×10^5 frumum/ml og þær forræktaðar í ræktunarflöskum í 48 til 96 klukkustundir. Daginn sem prófið er framkvæmt eru frumur, sem eru heimtar úr ræktunarflöskunni, þvegnar með RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi án allra sýkladrepandi efna og síðan enduruppleystar með RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafósturssermi án allra sýkladrepandi efna með 1×10^6 frumur/ml. Síðan er frumunum dreift í 96 holu bakka með flatri botnplötu (t.d. Costar Cat#3 603) með 50µl (5×10^4 frumur/holu).

Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

17. Prófunaríðefni og samanburðaefni eru tilreidd á prófunardegi. Að því er varðar IL-8 Luc-prófið eru prófunaríðefnin leyst upp í X-VIVO™ 15, sermislausu æti sem er fáanlegt á almennum markaði (Lonza, 04-418Q), í lokastyrk sem nemur 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 er bætt við 20 mg af prófunaríðefninu (óháð leysni íðefnisins) í örskilvinduglasi og fyllt upp að rúmmálinu 1 ml, síðan hringsnúið kröftuglega og hrist á snúði, á hraða sem er í mesta lagi 8 snún./mín., í 30 mínútur við u.þ.b. 20 °C umhverfishita. Ef föst íðefni eru enn óleysanleg er tilraunaglasið sett í hátíðnihljóðsundrun þangað til íðefnið er alveg uppleyst eða myndar stöðuga dreifilausn. Að því er varðar prófunaríðefni sem eru uppleysanleg í X-VIVO™ 15 er lausnin þynnt, með stuðlinum 5, með X-VIVO™ 15 og notuð sem X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefnisins (4 mg/ml). Að því er varðar prófunaríðefni, sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15, er blöndunni snúið aftur í a.m.k. 30 mínútur, síðan skilin í skilvindu við 15,000 snún./mín. (≈20 000*g*) í 5 mínútur; flotið sem verður til er notað sem X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefnisins. Færa skal fullnægjandi vísindaleg rök fyrir notkun annarra leysa, s.s. dímetýlsúlfoxíðs, vatns eða ræktunarætis. Nákvæmt verklag til að leysa upp íðefni er sýnt í viðbæti 3.5. X-VIVO™ 15-lausnirnar, sem lýst er í 18.–23. lið, eru blandaðar í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) með frumusviflausnum sem eru tilreiddar í 96 holu bakka með flatri botnplötu (sjá 16. lið).

18. Fyrsta prófunarkeyrslan miðar að því að ákvarða frumueitrandi styrk og að rannsaka húðnæmingarmátt íðefna. Með því að nota X-VIVO™ 15 eru gerðar raðþynningar af X-VIVO™ 15 stofnlausn prófunaríðefna með þynningarstuðlinum 2 (sjá viðbæti 3.5) og notaður er 96 holu greiningarbakki (e. *assay block*) (t.d. Costar Cat#EW-1 729-03). Næst er 50 µl/holu af þynntri lausn bætt við 50 µl af frumusviflausn í 96 holu bakka með flatri botnplötu. Af þessum sökum, að því er varðar prófunaríðefni sem eru uppleysanleg í X-VIVO™ 15, er lokastyrkur prófunaríðefnanna á bilinu frá 0,002 til 2 mg/ml (viðbætir 3.5). Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml eru einungis þynningarstuðlar á bilinu frá 2 til 2^{10} ákvarðaðir þó að óvissa ríki um raunverulega lokastyrki prófunaríðefnanna og eru háðir mettunarstyrk prófunaríðefnanna í X-VIVO™ 15 stofnlausninni.

19. Í síðari prófunarkeyrslum (þ.e. annarri, þriðju og fjórðu samhliða prófun) er stofnlausn X-VIVO™ 15 tilreidd í styrk sem er fjórfalt hærri en styrkur fyrir lífvænleika frumna 05 (CV05; lægsti styrkur þar sem Inh-GAPLA verður <0.05) í fyrstu tilrauninni. Ef Inh-GAPLA fellur ekki niður fyrir 0,05 við hæsta styrk í fyrstu keyrslu er X-VIVO™ 15 stofnlausnin tilreidd með hæsta styrknum í fyrstu keyrslunni. Styrkur CV05 er reiknaður út með því að deila styrk stofnlausnarinnar í fyrstu keyrslu með þynningarstuðlinum fyrir CV05 (X) (þynningarstuðull CV05 (X); sá þynningarstuðull sem þarf til að þynna stofnlausn niður í CV05) (sjá viðbæti 3.5). Að því er varðar prófunaríðefni sem eru ekki uppleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml er CV05 ákvarðað með styrk stofnlausnar x 1/X. Fyrir keyrslur 2 til 4 er tilreidd önnur stofnlausn með styrkleikann 4 x CV05 (viðbætir 3.5).

20. Raðþynningar annarrar X-VIVO™ 15 stofnlausnarinnar eru tilreiddar með þynningarstuðlinum 1,5 og notaður er 96 holu greiningarbakki. Næst er 50 µl/holu af þynntri lausn bætt við 50 µl af frumusviflausn í holur 96 holu bakka með flatri botnplötu. Hver styrkleiki hvers prófunaríðefnis skal prófaður í 4 holum. Síðan eru sýnin blönduð á bakkahristara og sett í ræktun í 16 klst. við 37 °C og 5% koltvísýring (CO_2) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er hér á eftir.

21. Samanburður með leysi er blanda af 50 µl/holu af X-VIVO™ 15 og 50 µl/holu af frumusviflausn í RPMI-1640 sem inniheldur 10% nautgripafóstursermi.

22. Jákvæður samanburður, sem mælt er með, er 4-nítróbensýlbrómíð. Tuttugu mg af 4-nítróbensýlbrómíði eru tilreidd í 1,5 ml örskilvinduglasi og X-VIVO™ 15 bætt við upp í 1 ml. Glasinu er hringsnúið kröftuglega og hrist á snúði, á hraða sem er í mesta lagi 8 snún./mín., í a.m.k. 30 mínútur. Eftir skiljun við 20 000g í 5 mínútur er flotið þynnt, með stuðlinum 4, með X-VIVO™ 15 og 500 µl af þynnta flotinu færðir yfir í holu í 96 holu greiningarbakka. Þynnta flotið er þynnt enn frekar með X-VIVO™ 15, með stuðlunum 2 og 4, og 50 µl af lausninni er bætt í 50 µl af THP-G8-frumusviflausn í holum í 96 holu bakka með flatri botnplötu (viðbætir 3.6). Hver styrkleiki jákvæða samanburðarins skal prófaður í 4 holum. Bakkinn er hristur á bakkahristara og settur í ræktun í CO_2-ræktunarkassa í 16 klst. (37 °C, 5% koltvísýringur (CO_2)) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er í 29. lið.

23. Neikvæður samanburður, sem mælt er með, er mjólkursýra. Tuttugu mg af mjólkursýru eru tilreidd í 1,5 ml örskilvinduglasi og X-VIVO™ 15 bætt við upp í 1 ml (20 mg/ ml). Tuttugu mg/ml af mjólkursýrulausn eru þynnt með X-VIVO™ 15, með stuðlinum 5 (4 mg/ml); 500 µl af þessari 4 mg/ml mjólkursýrulausn eru færðir yfir í holu í 96 holu greiningarbakka. Þessi lausn er þynnt með X-VIVO™ 15, með stuðlinum 2, og síðan þynnt aftur með stuðlinum 2 til að fá 2 mg/ml og 1 mg/ml lausnir. Fimmtíu µl af þessum þremur lausnum og samanburði með burðarefni (X-VIVO™ 15) er bætt við 50 µl af THP-G8-frumusviflausn í holur á 96 holu bakka með flatri botnplötu. Hver styrkleiki neikvæða samanburðarins er prófaður í 4 holum. Bakkinn er hristur á bakkahristara og settur í ræktun í CO_2-ræktunarkassa í 16 klst. (37 °C, 5% koltvísýringur (CO_2)) og eftir það er lúsíferasavirknin mæld eins og lýst er í 29. lið.

24. Nota má aðra heppilega jákvæða eða neikvæða samanburði ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur.

25. Þess skal gætt að forðast uppgufun rokgjarnra prófunaríðefna og víxlmengun prófunaríðefna milli hola, t.d. með því að hylja bakkann fyrir ræktunina með prófunaríðefnunum.

26. Prófunaríðefni og samanburður með leysi útheimta 2 til 4 keyrslur til að leiða út jákvæða eða neikvæða spá (sjá töflu 2). Hver keyrsla er gerð á mismunandi degi með nýrri stofnlausn prófunaríðefnisins X-VIVO™ 15 og frumum sem eru heimtar meðan þær eru ósamfelldar. Frumur mega vera úr sömu umsáningu.

Mælingar á virkni lúsíferasa

27. Ljómun er mæld með örbakkaljósmæli með 96 holum sem er búinn ljóssíum, t.d. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Þýskaland) og ARVO-röðin (PerkinElmer, Waltham, MA, Bandaríkin). Kvarða skal ljósmælinn fyrir hvert próf til að tryggja samanburðarnákvæmni (19. heimild). Raðbrigða-lúsíferasar, sem senda frá sér appelsínugulan og rauðan lit, eru fáanlegir fyrir þessa kvörðun.

28. Hundrað µl af forhituðu Tripluc®-prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (Tripluc) eru færðir yfir í hverja holu á bakka sem inniheldur frumusviflausn sem er meðhöndluð með eða án íðefnis. Bakkinn er hristur í 10 mínútur við umhverfishita sem nemur u.þ.b. 20 °C. Bakkinn er settur í ljósmælinn til að mæla lúsíferasavirknina. Lífljómun er mæld í 3 sekúndur án ljóssíunnar (F0) og með ljóssíunni (F1). Færa skal rök fyrir því ef annars konar fyrirkomulag er notað, t.d. notkun á annarri tegund ljósmælis.

29. Breytur fyrir hvern styrk eru reiknaðar út frá mældum gildum, t.d. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, meðaltal ±SD fyrir IL8LA, meðaltal ±SD fyrir GAPLA, meðaltal ±SD fyrir nIL8LA, meðaltal ±SD fyrir Ind-IL8LA, meðaltal ±SD fyrir Inh-GAPLA, og 95% öryggisbil fyrir Ind-IL8LA. Skilgreiningar á breytunum sem eru notaðar í þessum lið eru gefnar í viðbætum 3.1 og 3.4.

30. Áður en mæling hefst er yfirleitt hægt að sundurgreina liti í fjöllita vísigensprófum með því að nota skynjara (ljósmæli og bakkalesara), sem er búinn ljóssíum, s.s. síum með skarpri afmörkun (e. *sharp-cut*) (langbylgju- eða stuttbylgjusíur (e. *long-pass*/*short-pass*)) eða bandsíum. Kvarða skal framferðarstuðla fyrir síurnar fyrir hvert lífljómunarlitmerki áður en prófunin er framkvæmd, samkvæmt viðbæti 3.2.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

31. Viðmiðanir fyrir jákvæða/neikvæða ákvörðun útheimta að í hverri keyrslu:

— sé spá með IL-8 Luc-prófi metin jákvæð ef prófunaríðefni er með Ind-IL8LA 1,4 og lægri mörkin fyrir 95% öryggisbilið fyrir Ind-IL8LA 1,0,

— sé spá með IL-8 Luc-prófi metin neikvæð ef prófunaríðefni er með Ind-IL8LA <1,4 og/eða lægri mörkin fyrir 95% öryggisbilið fyrir Ind-IL8LA <1,0.

Spálíkan

32. Prófunaríðefni, sem gefa tvær jákvæðar niðurstöður í fyrstu, annarri, þriðju eða fjórðu keyrslu, eru greind sem jákvæð en þau sem gefa þrjár neikvæðar niðurstöður í fyrstu, annarri, þriðju eða fjórðu keyrslu eru greind sem „talin neikvæð“ (tafla 2). Í hópi efna, sem talin eru neikvæð, eru íðefni, sem leysast upp í 20 mg/ml af X-VIVO^{TM} 15, metin sem neikvæð en ekki skal taka með íðefni sem leysast ekki upp í 20 mg/ml af X-VIVO^{TM} 15 (mynd 1).

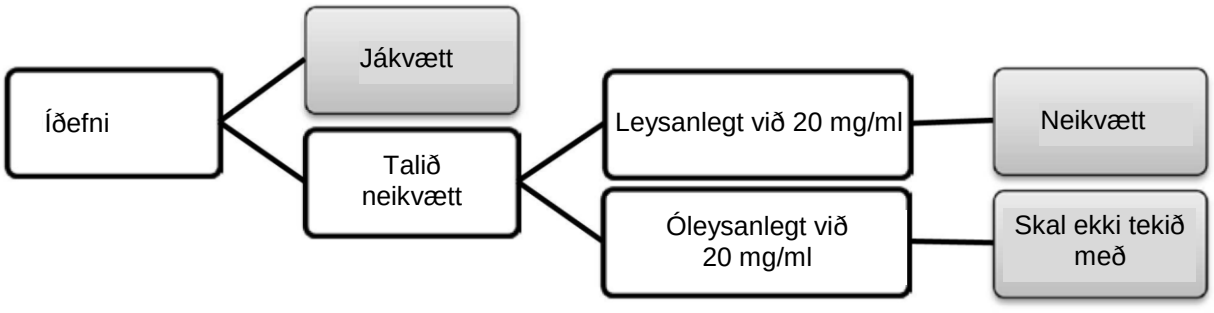
Tafla 2

Viðmiðanir til að greina jákvæðar niðurstöður og niðurstöður sem eru taldar neikvæðar

Fyrsta keyrsla	Önnur keyrsla	Þriðja keyrsla	Fjórða keyrsla	Endanleg spá
Jákvæð	Jákvæð	—	—	Jákvæð
	Neikvæð	Jákvæð	—	Jákvæð
		Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð
			Neikvæð	Talin neikvæð
Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	—	Jákvæð
		Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð
			Neikvæð	Talin neikvæð
	Neikvæð	Jákvæð	Jákvæð	Jákvæð
			Neikvæð	Talin neikvæð
		Neikvæð	—	Talin neikvæð

Mynd 1

Spálíkan fyrir endanlegt mat



Samþykktarviðmiðanir

33. Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar IL-8 Luc-próf er notað.

— Ind-IL8LA skal vera yfir 5,0 í a.m.k. einum styrkleika af jákvæða samanburðinum 4-nítróbensýlbrómíði í hverri keyrslu.

— Ind-IL8LA skal vera undir 1,4 í sérhverjum styrkleika af neikvæða samanburðinum mjólkursýru í hverri keyrslu.

— Gögnum úr bökkum, þar sem GAPLA í samanburðarholum með frumum og Tripluc en án íðefna er innan við fimmfalt lægra en í holu sem inniheldur einungis prófunaræti (50 µl/holu af RPMI-1 640 sem inniheldur 10% nautgripafóstursermi og 50 µl/holu af X-VIVO™ 15), skal hafnað.

— Gögnum úr bökkum þar sem Inh-GAPLA allra styrkleika prófunarinnar eða viðmiðunaríðefna er minna en 0,05 skal hafnað. Í því tilviki skal endurtaka fyrstu prófunina þannig að hæsti lokastyrkur endurteknu prófunarinnar sé lægsti lokastyrkur fyrri prófunarinnar.

Prófunarskýrsla

34. 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).

— Leysni í X-VIVO™ 15. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15, hvort útfelling eða flot koma fram eftir skiljun.

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni ef X-VIVO™ 15 var ekki notað.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda:

— Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér að framan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér að framan), 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).

— Leysni í X-VIVO™ 15. Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15, hvort útfelling eða flot koma fram eftir skiljun.

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi/burðarefni fyrir hvert prófunaríðefni ef X-VIVO™ 15 var ekki notað.

Samanburður

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 samþykktarviðmiðanir, ef við á.

Neikvæður 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 samanburðir eru notaðir en þau sem getið er um í viðmiðunarreglum um prófanir 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.

Prófunarskilyrði

— Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

— Lýsing á prófuninni sem er notuð.

— Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).

— Lotunúmer og uppruni nautgripafósturssermis, lotunúmer 96 holu bakka með flatri botnplötu og lotunúmer Tripluc-prófefnis.

— Fjöldi umsáninga og frumuþéttleiki sem eru notuð við prófun.

— Frumutalningaraðferð sem er notuð fyrir sáningu áður en prófað er og ráðstafanir sem gerðar eru til að tryggja einsleita dreifingu frumufjöldans.

— 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 3.2. viðbæti.

— Verklagið sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófun (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða til að sýna fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunarinnar yfir lengri tíma.

Prófunaraðferð

— Fjöldi samhliða prófana og keyrslna sem eru framkvæmdar.

— Styrkur prófunaríðefnis, íbætingaraðferð og váhrifatími (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

— Mælingar á IL8LA og GAPLA.

— Útreikningar á nIL8LA, Ind-IL8LA, og Inh-GAPLA.

— 95% öryggisbil fyrir Ind-IL8LA.

— 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 IL-8 Luc-prófinu.

— Athugun á niðurstöðum prófsins með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

Ályktun

HEIMILDIR

1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1 816-30.

7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1 286-91.

13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8 271-9.

14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Aðgengilegt á: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1 046-9.

20) 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, France.

21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth 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_rev05/05files_e.html.

Viðbætir 3.1

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Þetta er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófun (16. 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* (20. heimild).

Íðefni: Efni eða blanda.

CV05: Lífvænleiki frumna 0,5, þ.e. lágmarksstyrkleiki þar sem íðefni sýna minna en 0,05 af Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til Ind-IL8LA. Sjá skilgreiningu í Ind-IL8LA.

GAPLA: Virkni SLR-lúsíferasa (Stable Luciferase Red) (hámark = 630 nm) sem er stýrt af GAPDH-stýrli og sýnir fram á lífvænleika frumna og fjölda lífvænlegra frumna.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi eða (undir)hópur 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

II-SLR-LA: Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til Inh-GAPLA. Sjá skilgreiningu í Inh-GAPLA.

IL-8 (hvítfrumuboði-8): Frumuboði, sem er fenginn frá innþekjufrumum, trefjakímfrumum, hyrnisfrumum, gleypifrumum og einkjörnungum, sem veldur efnatogi daufkyrninga og T-eitilfrumna.

IL8LA: Virkni SLO-lúsíferasa (Stable Luciferase Orange) (hámark = 580 nm) sem er stýrt af IL-8-stýrli.

Ind-IL8LA: Margfeldi vakningar nIL8LA. Það fæst með því að deila í nIL8LA fyrir THP-G8-frumur, sem eru meðhöndlaðar með íðefnum, með nIL8LA fyrir THP-G8-frumur sem eru ekki örvaðar og sýnir örvun á virkni IL-8-stýrils af völdum íðefna.

Inh-GAPLA: Hömlun GAPLA. Þetta fæst með því að deila í GAPLA fyrir THP-G8, sem er meðhöndlað með íðefnum, með GAPLA fyrir ómeðhöndlað THP-G8 og sýnir frumueiturhrif íðefna.

Lægstu örvunarmörk (MIT): lægsti styrkur þar sem íðefnið uppfyllir jákvæðar viðmiðanir.

Blanda: Blanda eða lausn tveggja eða fleiri efna.

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 af aðalefnisþáttunum 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.

nIL8LA: Virkni SLO-lúsíferasa sem endurspeglar virkni IL-8-stýrils (IL8LA), stöðluð með virkni SLR-lúsíferasa sem endurspeglar virkni GAPDH-stýrils (GAPLA). Þetta sýnir virkni IL-8-stýrils eftir að tekið hefur verið tillit til lífvænleika frumna eða frumufjölda.

nSLO-LA: Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til nIL8LA. Sjá skilgreiningu í nIL8LA.

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.

Ólífrænt umbreyttir meðvakar: Íðefni sem verða næmandi efni með ummyndun án tilstillis lífvera.

Lífrænt umbreyttir meðvakar: Íðefni sem þurfa ensímvirkjun til að hafa húðnæmingarmátt.

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) prófunar (16. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófun með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir lengri tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (16. heimild).

Keyrsla: Keyrsla samanstendur af einu eða fleirum prófunaríðefnum sem eru prófuð samskeiða með samanburði með leysi/burðarefni og með jákvæðum samanburði.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (16. heimild).

SLO-LA: Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til IL8LA. Sjá skilgreiningu í IL8LA.

SLR-LA: Skammstöfun sem er notuð í fullgildingarskýrslunni og í fyrri útgáfum, að því er varðar IL-8 Luc-prófið, til að vísa til GAPLA. Sjá skilgreiningu í GAPLA.

Samanburður með leysi/burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum/burðarefninu sem er notað. Hann er notaður til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýni sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er uppleyst í eða myndar stöðuga dreifilausn í sama leysi/burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða samanburðarsýni með æti sýnir það einnig fram á hvort leysirinn/burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Þetta er mælikvarði á nákvæmni prófunar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunar (16. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða fengin með framleiðsluferli, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar og öll óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysar sem skilja má frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

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. (TG437)

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari aðferð.

THP-G8: Frumulína með vísigenið IL-8 sem er notuð í IL-8 Luc-prófinu. Gleypifrumulík (e. *macrophage-like*) frumulína úr mönnum, THP-1, sem er innleidd með lúsíferasagenunum SLO og SLR, undir stjórn IL-8- og GAPDH-stýrla, eftir því sem við á.

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 (21. heimild).

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófunaraðferð: Prófun sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófun er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang.

Viðbætir 3.2

MEGINREGLA FYRIR MÆLINGU Á LÚSÍFERASAVIRKNI OG ÁKVÖRÐUN Á FRAMFERÐARSTUÐLUM LJÓSSÍU FYRIR SLO OG SLR

Hægt er að nota Tripluc, greiningarkerfi til að greina mörg vísigen, ásamt ljósmæli fyrir örbakka með fjöllita greiningarkerfi sem unnt er að búa ljóssíu (t.d. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Ljóssían, sem er notuð í mælingunni, er 600–620 nm löng langbylgju- eða stuttbylgjusía eða 600–700 nm bandsía.

Mæling á lúsíferasa með tveimur litum með ljóssíu

Þetta er dæmi með notkun Phelios AB-2350 (ATTO). Þessi ljósmælir er búinn 600 nm langbylgjusíu (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filter 1) til að skipta ljómuninni milli SLO (hámark = 580 nm) og SLR (hámark = 630 nm).

Til að ákvarða framferðarstuðla fyrir 600 nm langbylgjusíu er byrjað á að mæla, með því að nota hreinsuð SLO- og SLR-lúsíferasaensím, i. lífljómunarstyrk SLO og SLR án síu (F0) og ii. lífljómunarstyrk SLO og SLR sem fór í gegnum 600 nm langbylgjusíu (Filter 1) og iii. reikna út framferðarstuðla fyrir 600 nm langbylgjusíu fyrir SLO og SLR eins og tilgreint er hér á eftir.

Framferðarstuðlar		Skammstöfun	Skilgreining
SLO	„Filter 1“ framferðarstuðlar	$=\kappa O_{R60}$	Framferðarstuðull síunnar fyrir SLO
SLR	„Filter 1“ framferðarstuðlar	κR_{R60}	Framferðarstuðull síunnar fyrir SLR

Þegar styrkleiki fyrir SLO og SLR í prófunarsýninu er skilgreindur sem O og R, eftir því sem við á, er i. styrkleika ljóss án síu (allt ljós), F0, og ii. styrkleika ljóss sem fer í gegnum 600 nm langbylgjusíu („Filter 1“), F1, lýst hér á eftir.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Þessar formúlur er hægt að umorða sem hér segir:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Síðan er hægt að reikna út O- og R-gildin, með því að nota útreiknaða gegnfararhlutfallsstuðla (κO_{R60} og κR_{R60}) og mæld gildi F0 og F1, sem hér segir:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Efni og aðferðir til að ákvarða gegnfararhlutfallsstuðla

1) *Prófefni*

Hreinsað lúsíferasaensím:

Frostþurrkað hreinsað SLO-ensím

Frostþurrkað hreinsað SLR-ensím

(sem voru fengin, vegna fullgildingarstarfsins, frá GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan með THP-G8-frumulínu)

Prófefni fyrir greiningu:

Tripluc®-prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (t.d. frá TOYOBO Cat#MRA-301)

Æti: fyrir lúsíferasagreiningu (30 ml, geymt við 2–8 ºC)

Prófefni	Styrkur	Lokastyrkur í æti	Tilskilið magn
RPMI-1640	—	—	27 ml
Nautgripafóstursermi	—	10%	3 ml

2) *Tilreiðsla ensímlausnar*

Frostþurrkað, hreinsað lúsíferasaensím er leyst upp í tilraunaglasi með því að bæta í það 200 µl af 10 ~ 100 mM Tris/vetnisklóríði eða Hepes/vetnisklóríði (pH-gildi 7.5 ~ 8.0) með viðbættu 10% (massi miðað við rúmmál) glýseróli, ensímlausninni er skipt niður í 10 µl deiliskammta í 1,5 ml einnota tilraunaglös og sett í frysti við -80 ºC. Hægt er að nota frystu ensímlausnina í allt að 6 mánuði. Þegar hún er notuð er 1 ml af lúsíferasagreiningaræti (RPMI-1640 með 10% nautgripafóstursermi) bætt í hvert tilraunaglas, sem inniheldur ensímlausnina (þynnt ensímlausn), og þau geymd á ís til að koma í veg fyrir óvirkjun.

3) *Lífljómunarmæling*

Tripluc® prófefni fyrir lúsíferasagreiningu (Tripluc) er afþítt og geymt við stofuhita, annaðhvort í vatnsbaði eða við umhverfishita. Setja skal ljósmælinn í gang 30 mínútum áður en mæling er hafin til að ljósmagnarinn verði stöðugur. Hundrað µl af þynntu ensímlausninni eru færðir yfir í svartan 96 holu bakka (flatbotna) (SLO-viðmiðunarsýnið í #B1, #B2, #B3, SLR-viðmiðunarsýnið í #D1, #D2, #D3). Síðan eru 100 µl af forhituðu Tripluc færðir með pípettu yfir í hverja holu á bakka sem inniheldur þynntu ensímlausnina. Bakkinn er hristur í 10 mínútur við stofuhita (u.þ.b. 25 °C) með því að nota bakkahristara. Ef loftbólur koma fram í lausnunum í holunum eru þær fjarlægðar. Bakkinn er settur í ljósmælinn til að mæla lúsíferasavirknina. Lífljómun er mæld í 3 sekúndur án ljóssíunnar (F0) og með ljóssíunni (F1).

Framferðarstuðull ljóssíunnar var reiknaður út sem hér segir:

Framferðarstuðull (SLO (κO_{R60}))= (#B1 við F1+ #B2 við F1+ #B3 við F1)/(#B1 við F0+ #B2 við F0+ #B3 við F0)

Framferðarstuðull (SLR (κR_{R60}))= (#D1 við F1+ #D2 við F1+ #D3 við F1)/(#D1 við F0+ #D2 við F0+ #D3 við F0)

Útreiknaðir gegnfararhlutfallsstuðlar eru notaðir fyrir allar mælingar sem eru framkvæmdar með því að nota sama ljósmæli.

Gæðaeftirlit með búnaði

Nota skal verklagið sem lýst er í IL-8 Luc-aðferðarlýsingunni (18. heimild).

Viðbætir 3.3

HÆFNISEFNI

Áður en prófunin, sem lýst er í þessum viðbæti við prófunaraðferð B.71, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá þá spá sem búist er við með IL-8 Luc-greiningunni fyrir hæfnisefnin 9, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir a.m.k. 8 af hæfnisefnunum 9 (valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu). Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin eru fáanleg á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir *í lífi*, sem og um rannsóknir *í glasi* sem verða til með IL-8 Luc-greiningunni, eru tiltæk. Birt tilvísunargögn eru einnig tiltæk fyrir IL-8 Luc-greininguna (6. og 1. heimild).

Tafla 1

Efni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega hæfni í tengslum við IL-8 Luc-greininguna

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Leysni í X-VIVO15 við 20 mg/ml	Spá *í lífi* (1)	IL-8 Luc-spá (2)	Viðmiðunarbil (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dínítróklóróbensen	97-00-7	Fast efni	Óleysanlegt	Næmir (mjög sterkur)	Jákvæð	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehýð	50-00-0	Vökvi	Leysanlegt	Næmir (sterkur)	Jákvæð	9–30	4–9
2-merkaptóbensóþíasól	149-30-4	Fast efni	Óleysanlegt	Næmir (meðalsterkur)	Jákvæð	250-290	60–250
Etýlendíamín	107-15-3	Vökvi	Leysanlegt	Næmir (meðalsterkur)	Jákvæð	500-700	0,1–0,4
Etýlenglýkóldímetakrýlat	97-90-5	Vökvi	Óleysanlegt	Næmir (vægur)	Jákvæð	> 2000	0,04–0,1
4-allýlanísól (estragól)	140-67-0	Vökvi	Óleysanlegt	Næmir (vægur)	Jákvæð	> 2000	0,01–0,07
Streptómýsínsúlfat	3810-74-0	Fast efni	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000
Ísóprópanól	67-63-0	Vökvi	Leysanlegt	Ekki næmir	Neikvæð	> 2000	> 2000

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

(1) Máttur *í lífi* er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumiðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (19. heimild).

(2) Byggt á sögulegum mældum gildum (1. og 6. heimild).

(3) CV_{05} og IL-8 Luc MIT (lægstu örvunarmörk) voru reiknuð út með því að nota vatnsleysni sem fékkst með EPI SuiteTM.

(4) CV_{05}: lágmarksstyrkleiki þar sem íðefni sýna minna en 0,05 af Inh-GAPLA.

(5) MIT (lægstu örvunarmörk): lægsti styrkur þar sem íðefnið uppfyllir jákvæðar viðmiðanir.

Viðbætir 3.4

STUÐLAR OG MATSVIÐMIÐANIR

nIL8LA (nSLO-LA)

J-unda endurtekningin (j = 1–4) fyrir i-unda styrkleikann (i = 0–11) er mæld fyrir IL8LA (SLO-LA) og GAPLA (SLR-LA), eftir því sem við á. Staðlað IL8LA, sem er nefnt nIL8LA (nSLO-LA), er skilgreint sem:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Þetta er grunnmælieiningin í þessu prófi.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA, sem er x-föld aukning meðaltals nIL8LA-gildisins (nSLO-LA) fyrir endurtekningu á i-unda styrkleika, samanborið við samsvarandi gildi fyrir 0-styrkleikann, er grundvallarmælingin í þessu prófi. Þetta hlutfall er skrifað með eftirfarandi formúlu:

$$\mathrm{Ind-\ IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{\mathrm{j}} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{\mathrm{j}} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Rannsóknarstofan sem leiddi rannsóknina, hefur lagt það til að gildi sem nemur 1,4 samsvari jákvæðri niðurstöðu fyrir prófaða íðefnið. Þetta gildi er byggt á rannsókn á rannsóknarsögulegum gögnum rannsóknarstofunnar sem leiddi rannsóknina. Síðan notaði gagnastjórnunarhópur þetta gildi í öllum áföngum fullgildingarrannsóknarinnar. Meginniðurstaðan, Ind-IL8LA, er hlutfall tveggja meðaltala eins og sýnt er í jöfnunni.

95% öryggisbil

Hægt er að áætla 95% öryggisbil, byggt á hlutfallinu, til að sýna nákvæmni þessarar niðurstöðu grundvallarmælingarinnar. Lægri mörk 95% öryggisbilsins ≥ 1 benda til þess að nIL8LA með i-unda styrk sé marktækt hærra en það sem fæst með samanburði með leysi. Það eru nokkrar leiðir til að ákvarða 95% öryggisbilið. Notuð var aðferð sem er þekkt sem „Fieller's theorem" í þessari rannsókn. Þessi kenning um 95% öryggisbil fæst með eftirfarandi formúlu:

$$\left[\frac{-\mathrm{B} - \sqrt{\mathrm{B^2 - 4AC}}}{2\mathrm{A}}, \frac{-\mathrm{B} + \sqrt{\mathrm{B^2 - 4AC}}}{2\mathrm{A}}\right],$$

Þar sem

$$\mathrm{A} = \bar{\mathrm{x}}_0^2 - \mathrm{t}_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{\mathrm{sd}_0^2}{\mathrm{n}_0},$$

$$\mathrm{B} = -2 \times \bar{\mathrm{x}} \times \bar{\mathrm{y}},$$

$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, og $n_0 = 4$,

$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$,

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j \left(nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0\right)^2$,

$n_{yi} = 4$,

$\bar{y}_i = \left(1/n_{yi}\right) \times \sum_j \left(nIL8LA_{ij}\right)$,

$sd_{yi}^2 = \left\{1/\left(n_{yj} - 1\right)\right\} \times \sum_j \left(nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i\right)^2$.

$t_{0.975(\nu)}$ er 97,5 hundraðshlutamark fyrir miðlæga t-dreifingu með frítöluna v, þar sem

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{\left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left(n_{yi} - 1\right)\right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA er hlutfall meðaltalsins fyrir GAPLA (SLR-LA) fyrir endurtekningu á i-unda styrkleika, samanborið við samsvarandi gildi fyrir samanburð með leysi, og er skrifað á eftirfarandi hátt:

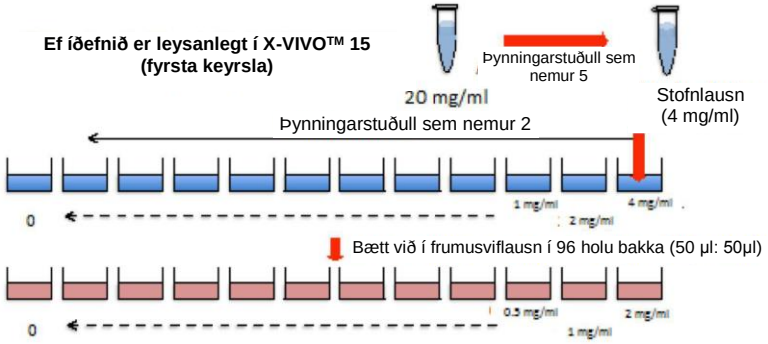
$$Inh - GAPLA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\right\}.$$

Þar ed GAPLA er nefnari fyrir nIL8LA veldur mjög lágt gildi miklum breytileika á nIL8LA. Þess vegna er e.t.v. hægt að líta á Ind-IL8LA-gildi með mjög lágu gildi Inh-GAPLA (minna en 0,05) sem mjög ónákvæm.

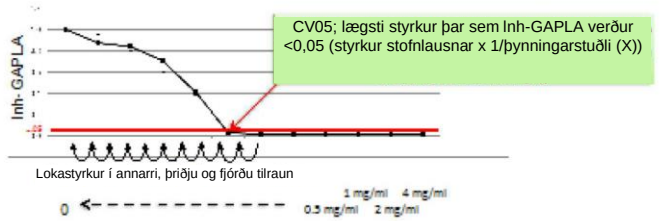
Viðbætir 3.5

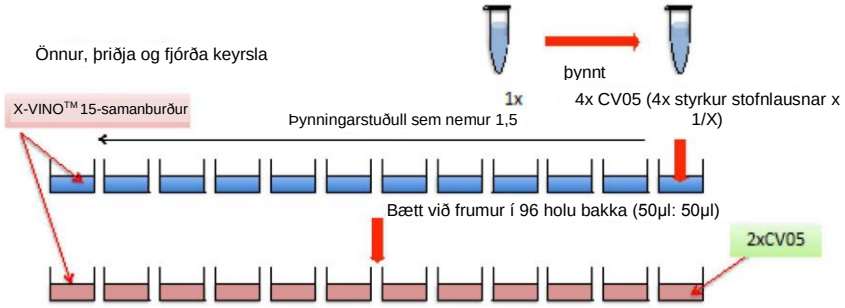
YFIRLIT YFIR AÐFERÐIR TIL AÐ LEYSA UPP ÍÐEFNI FYRIR IL-8 LUC-PRÓFIÐ

a) Að því er varðar íðefni sem eru leysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml

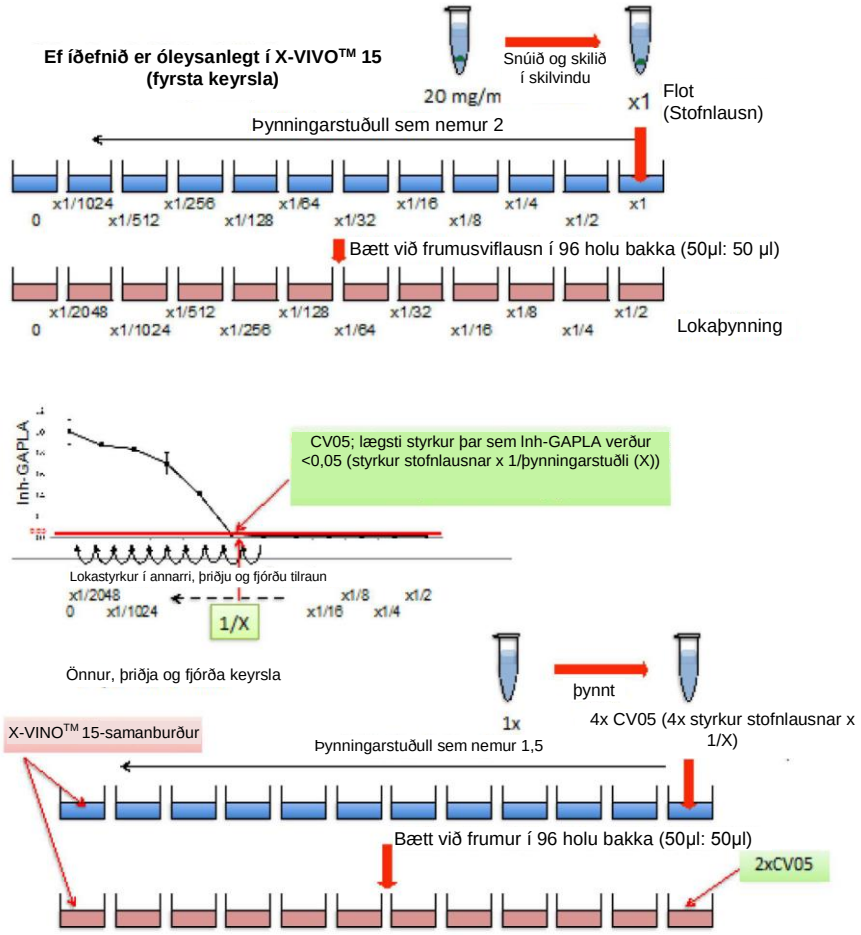


Hæsti styrkur í eftirfarandi tilraunum er ákvarðaður





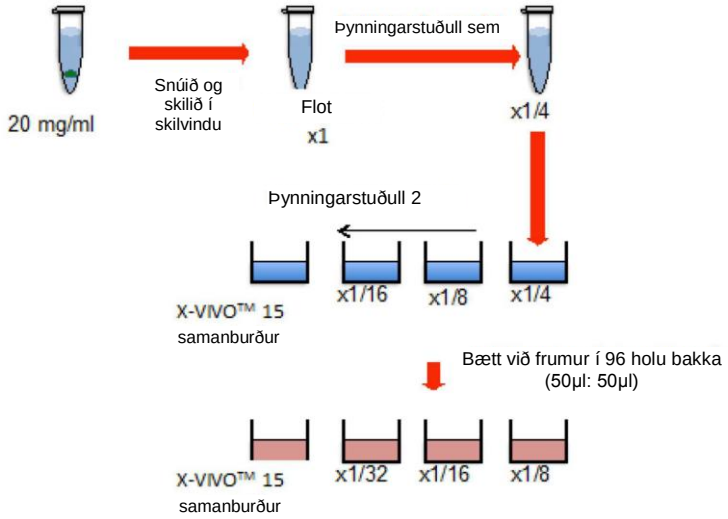
b) Að því er varðar íðefni sem eru óleysanleg í X-VIVO™ 15 við 20 mg/ml



Viðbætir 3.6

YFIRLIT YFIR AÐFERÐINA TIL AÐ LEYSA UPP 4-NÍTRÓBENSÝLBRÓMÍÐ FYRIR JÁKVÆÐAN SAMANBURÐ FYRIR IL-8 LUC-PRÓFIÐ

Jákvæður samanburður: 4-nítróbensýlbrómíð
(óleysanlegt í X-VIV0™ 15)



9) Í C-hluta er eftirfarandi köflum bætt við:

„C.52 **FRAMLENGD EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUN Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 240 um prófanir (2015). Í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) er lýst heildarprófunaraðferð sem byggist á því að margar kynslóðir fiska eru látnar verða fyrir váhrifum til að fá fram gögn sem skipta máli fyrir vistfræðilega hættu og áhættumat á íðefnum, þ.m.t. íðefni sem grunur er um að séu innkirtlatruflandi. Váhrifin í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) halda áfram fram að klaki (þangað til tveimur vikum eftir frjóvgun) hjá annarri kynslóðinni (F2). Þörf er á viðbótarrannsóknum til að rökstyðja gagnsemi þess að lengja líftíma F2-kynslóðarinnar umfram klak; sem stendur eru ekki fyrir hendi fullnægjandi upplýsingar til að sjá fyrir viðeigandi skilyrðum eða viðmiðunum sem gefa tilefni til að lengja líftíma F2-kynslóðarinnar. Þegar nýjar upplýsingar og gögn eru tekin til athugunar má þó uppfæra þessa prófunaraðferð til samræmis við það. Til dæmis geta leiðbeiningar um að lengja líftíma F2-kynslóðarinnar til enda æxlunarfasans hugsanlega verið gagnlegar við tilteknar aðstæður (t.d. íðefni með mikinn lífþéttnimátt eða vísbendingar um áhrif sem flytjast milli kynslóða (e. *trans-generational*) hjá öðrum lífverum). Þessa prófunaraðferð er hægt að nota til að meta möguleg langvinn áhrif íðefna á fisk, þ.m.t. íðefni sem eru hugsanlega innkirtlatruflandi. Í aðferðinni er aðaláherslan lögð á möguleg stofntengd áhrif (þ.e.a.s. neikvæð áhrif á lifun, þroskun, vöxt og æxlun) til að reikna út styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) eða hrifstyrk (ECx) en þó skal bent á að ECx-nálganir henta sjaldan fyrir stórar rannsóknir af þessu tagi þar sem það getur verið óhagkvæmt að fjölga prófunarstyrkleikum til að unnt sé að ákvarða tilætlað ECx og getur einnig valdið verulegum áhyggjum af velferð dýra vegna mikils fjölda dýra sem er notaður. Að því er varðar íðefni sem þarf ekki að meta yfir „margar kynslóðir“ eða íðefni sem eru hugsanlega innkirtlatruflandi geta aðrar prófunaraðferðir hentað betur (1. heimild). Japanskur rískarpi er hentug tegund til notkunar í þessari prófunaraðferð vegna þess að lífsferill hans er stuttur og mögulegt er að ákvarða erfðafræðilegt kyn hans (2. heimild) sem telst vera mikilvægur þáttur í þessari prófunaraðferð. Þær sértæku aðferðir og athugunarendapunktar sem eru útlistuð í þessari aðferð eiga einungis við um japanskan rískarpa. Hægt er að laga aðrar litlar fisktegundir (t.d. sebradanna) að svipaðri aðferðarlýsingu prófunar.

2. Í þessari prófunaraðferð eru nokkrir líffræðilegir endapunktar mældir. Megináhersla er lögð á möguleg skaðleg áhrif á stofntengda mæliþætti, þ.m.t. lifun, heildarþroskun, vöxt og æxlun. Í öðru lagi, í því skyni að veita upplýsingar um gangvirki og skapa tengsl milli niðurstaðna frá annars konar sviðum og rannsóknum á rannsóknarstofu þegar sannanir fyrir því að íðefni hafi hugsanlega innkirtlatruflandi áhrif koma í ljós eftir á (t.d. andrógen- eða estrógenvirkni í öðrum prófunum og rannsóknum), fást aðrar gagnlegar upplýsingar með því að mæla mRNA vítellógeníns (vtg) (eða vítellógenínprótín, VTG), svipfarsleg annars stigs kyneinkenni (SSC) í tengslum við erfðafræðilegt kyn og gera vefjameinafræðilegt mat. Það skal tekið fram að ef ekki er grunur um að prófunaríðefni eða umbrotsefni þess séu innkirtlatruflandi íðefni er e.t.v. ekki nauðsynlegt að mæla þessa aukaendapunkta og rannsóknir þar sem minna af aðföngum og færri dýr eru nýtt geta hentað betur (1. heimild). Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.

ATRIÐI OG TAKMARKANIR SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

3. Vegna takmarkaðs fjölda prófaðra íðefna og rannsóknarstofa sem taka þátt í fullgildingu á þessari frekar flóknu rannsókn er fyrirsjáanlegt að þegar fullnægjandi fjöldi rannsókna liggur fyrir til að ganga úr skugga um áhrif þessarar nýju rannsóknarhönnunar verði prófunaraðferðin rýnd og, ef nauðsyn krefur, endurskoðuð í ljósi þeirrar reynslu sem fengist hefur. Hægt er að nota gögnin á 5. stigi „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters“ („Hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi efnum“) (3. heimild). Prófunaraðferðin hefst með því að fullvaxnir fiskar (F0-kynslóðin) eru látnir verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu í æxlunarfasanum. Váhrifin halda áfram meðan þroskun og æxlun stendur yfir hjá F1-kynslóðinni og klak hjá F2-kynslóðinni; þannig gerir rannsóknin kleift að meta innkirtlaferli út frá bæði byggingu og virkjun. Hægt er að gera greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga við túlkun á endapunktum í tengslum við innkirtla.

4. Prófunin skal innihalda nægilega marga einstaklinga til að tryggja fullnægjandi afl til að meta æxlunartengda endapunkta (sjá 3. viðbæti) og tryggja um leið að fjöldi dýra, sem er notaður, sé það lágmark sem þarf af ástæðum sem varða velferð dýra. Í ljósi mikils fjölda tilraunadýra sem er notaður er mikilvægt að íhuga vandlega þörfina fyrir prófunina í tengslum við fyrirliggjandi gögn sem þegar innihalda e.t.v. viðeigandi upplýsingar um marga af endapunktunum í framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT). Einhverja aðstoð að því er þetta varðar er hægt að fá úr „OECD Fish Toxicity Testing Framework“ (1. heimild).

5. Prófunaraðferðin var fyrst og fremst hönnuð til að greina áhrifin frá einu efni. Ef þörf er á að prófa blöndu í eftirlitsskyni skal þó skoða hvort hún geti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi.

6. Áður en prófunin hefst er mikilvægt að búa yfir upplýsingum um eðlisefnafræðilega eiginleika prófunaríðefnisins, einkum til að unnt sé að framleiða stöðugar íðefnalausnir. Einnig er nauðsynlegt að vera með greiningaraðferð með nægilegu næmi til að sannreyna styrkleika prófunaríðefnis.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

7. Prófunin hefst á því að kynþroska hængar og hrygnur eru látin verða fyrir váhrifum (a.m.k. 12 vikur eftir frjóvgun) í undaneldispörum í 3 vikur en á þessu tímabili dreifist prófunaríðefnið í lífverunum af foreldrakynslóðinni (F0-kynslóðin) samkvæmt eiturhvarfafræðilegri hegðun þess. Eins nálægt fyrsta degi fjórðu viku og er mögulegt er hrognunum safnað til að koma F1-kynslóðinni af stað. Meðan eldi F1-kynslóðarinnar stendur yfir (samtals 15 vikur) eru klakgeta og lifun metin. Að auki er tekið sýni úr fiskinum 9–10 vikum eftir frjóvgun m.t.t. endapunkta þroskunar og hrygning er metin í þrjár vikur, frá 12. til og með 14. viku eftir frjóvgun. F2-kynslóðinni er komið af stað eftir þriðju viku æxlunarmatsins og hún alin þangað til klaki er lokið.

GILDISVIÐMIÐANIR PRÓFUNAR

8. Eftirfarandi viðmiðanir eiga við fyrir gildisviðmiðanir prófunar:

— Styrkur uppleysts súrefnis skal vera ≥ 60% af mettunargildi lofts í allri prófuninni.

— Meðalhiti vatns allan tímann meðan rannsóknin stendur yfir skal vera á bilinu 24 til 26 °C. Stutt frávik frá meðaltalinu í einstaka kerjum skal ekki vera meira en 2 °C.

— Meðalfrjósemismáttur samanburðarhópa í hverri kynslóð (F0-kynslóðinni og F1-kynslóðinni) skal vera yfir 20 hrogn á dag á hvert par. Frjósemi allra hrogna, sem hrygnt er meðan matið stendur yfir, skal vera yfir 80%. Þar að auki skulu 16 af tillögðum 24 undaneldispörum í samanburðinum (> 65%) hrygna yfir 20 hrognum á dag á hvert par.

— Klakgeta hrogna skal vera yfir 80% (meðaltal) í samanburðinum (hjá hverri F1-kynslóð og F2-kynslóð).

— Lifun eftir klak þangað til 3 vikum eftir frjóvgun og frá því 3 vikum eftir frjóvgun og þangað til F1-kynslóðin er aflífuð (þ.e. 15 vikum eftir frjóvgun) skal vera ≥ 80% (meðaltal) og ≥ 90% (meðaltal), eftir því sem við á, í samanburðunum (F1-kynslóðin).

— 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.

Að því er varðar vatnshitastig, þó að það sé ekki gildisviðmiðun, skulu samhliða prófanir innan meðferðar ekki vera tölfræðilega ólíkar hver annarri og meðferðarhópar innan prófunar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkir hver öðrum (byggt á daglegum mælingum á hitastigi og að undanskildum stuttum frávikum).

9. Þó að minni fjölgun kunni að koma fram í hópum sem verða fyrir meiri váhrifum skal fjölgunin vera nægileg í a.m.k. hópnum sem fær þriðja stærsta skammtinn og öllum hópum af F0-kynslóðinni, sem fá minni skammta, til að fylla klakkassana. Enn fremur skal lifun fósturvísa í hópnum sem fær þriðja stærsta skammtinn og hópum af F1-kynslóðinni, sem fá minni skammta, vera nægileg til að unnt sé að meta endapunktana við sýnatöku úr svo til fullvöxnum fiskum (sjá 36. og 38. lið og 9. viðbæti). Þar að auki skal lifun eftir klak a.m.k. ná lágmarkinu (~20%) í þeim hópi af F1-kynslóðinni sem fær næststærsta skammtinn. Þetta eru ekki gildisviðmiðanir sem slíkar heldur ráðleggingar til að unnt sé að reikna út trausta styrkleika sem hafa engin merkjanleg áhrif.

10. Ef frávik frá gildisviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunarniðurstaðnanna og þessi frávik og atriði skulu koma fram í prófunarskýrslunni.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

11. 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) tankar úr efnafræðilega óvirku efni og hæfilega stórir miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall og þéttleika (sjá 3. viðbæti),

e) nægilega nákvæm vog (þ.e. nákvæmni upp á ± 0,5 mg).

Vatn

12. 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. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunaríðefninu) eða að það hafi ekki 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. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl-,SO42-), varnarefnum, heildarmagni lífræns kolefnis og svifagna skulu t.d. gerðar á sex mánaða fresti ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 2. viðbæti. pH-gildi vatnsins skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig.

Váhrifakerfi

13. Hönnun og efni sem eru notuð í váhrifakerfið eru ekki tilgreind. Nota skal gler, ryðfrítt stál eða annað efnafræðilega óvirkt efni til að smíða prófunarkerfi sem hefur ekki verið mengað í fyrri prófunum. Að því er varðar þessa prófun má hentugt váhrifakerfi samanstanda af kerfi með samfelldu gegnumstreymi (4.–13. heimild).

Prófunarlausnir

14. Stofnlausn prófunaríðefnisins skal sett í váhrifakerfið með viðeigandi dælu. Kvarða skal streymi stofnlausnarinnar í samræmi við greiningarlega staðfestingu á prófunarlausnunum áður en váhrif hefjast og mæla rúmmál hennar reglulega meðan prófunin stendur yfir. Prófunarlausnin í hverju hólfi er endurnýjuð á fullnægjandi hátt (t.d. að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjanir/dag og allt að 16 rúmmálsendurnýjanir/dag eða streymi allt að 20 ml/mín), með hliðsjón af stöðugleika prófunaríðefnisins og vatnsgæðum.

15. 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- og/eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur/-kerfi eða hlutlaus skömmtunarkerfi (14. heimild) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Reyna skal eftir megni að forðast leysa eða burðarefni sökum þess að: 1) tilteknir leysar geta sjálfir leitt til eiturhrifa og/eða óæskilegra eða óvæntra viðbragða, 2) prófanir á íðefnum ofan við vatnsleysni þeirra (eins og getur oft gerst með notkun leysa) geta leitt til ónákvæmra ákvarðana á hrifstyrk, 3) notkun á leysum í lengri prófunum getur leitt til verulegrar „örveruþekju“ tengdri örveruvirkni og getur haft áhrif á umhverfisaðstæður sem og getu til að viðhalda váhrifastyrkleikum og 4) ef rannsóknarsöguleg gögn sem sýna fram á að leysirinn hafi ekki áhrif á niðurstöður rannsóknarinnar eru ekki fyrir hendi útheimtir notkun leysa samanburðarmeðferð með leysi sem hefur áhrif á velferð dýra þar eð þörf er á viðbótardýrum til að framkvæma prófunina. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á er hægt að nota leysi sem síðasta úrræði og 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) (15. heimild) til að ákvarða bestu aðferðina. Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og tiltækileika rannsóknarsögulegra gagna um notkun leysisins. Ef leysar er notaðir sem burðarefni skal meta viðeigandi samanburðarprófanir með leysi til viðbótar við samanburðarprófanir án leysis (neikvæðar) (einungis þynningarvatn). Ef til þess kemur að ekki er hægt að komast hjá því að nota leysi og örveruvirkni (örveruþekja) verður til er mælt með því að skrá/gefa skýrslu um örveruþekjuna í hverjum tanki (a.m.k. vikulega) í allri prófuninni. Helst ætti að halda styrk leysisins stöðugum í samanburðinum með leysi og öllum prófunarmeðferðunum. Ef styrk leysis er ekki haldið stöðugum skal nota hæsta styrk leysisins í prófunarmeðferðinni í samanburðinum með leysi. Í tilvikum þar sem leysir er notaður sem burðarefni skal hámarksstyrkur leysis ekki fara yfir 100 µl/l eða 100 mg/l (15. heimild) og mælt er með því að halda styrk leysisins eins lágum og unnt er (t.d. <20 µl/l) til að komast hjá hugsanlegum áhrifum leysisins á mælda endapunkta (16. heimild).

Tilraunadýr

Val á fiskum og eldi fiskanna

16. Prófunartegundin er japanskur rískarpi, *Oryzias latipes*, vegna þess að lífsferill hans er stuttur og mögulegt er að ákvarða erfðafræðilegt kyn hans. Þó að unnt sé að laga aðrar litlar fisktegundir að svipaðri aðferðarlýsingu prófunar eiga sértækar aðferðir og athugunarendapunktar, sem eru útlistuð í þessari prófunaraðferð, einungis við um japanskan rískarpa. Auðvelt er að fá japanskan rískarpa til að æxlast í haldi; birtar aðferðir eru fyrir hendi varðandi ræktun hans (17.–19. heimild) og gögn eru tiltæk úr prófunum varðandi banvæn áhrif til skamms tíma, prófunum á fyrri stigum lífs og heildarlífsferlisprófunum (5.–6. heimild, 8.–9. heimild og 20. heimild). Öllum fiskum er haldið við ljóslotu með birtu í 16 klst. og myrkur í 8 klst. Fiskurinn er fóðraður á lifandi saltvatnsrækjulirfum, *Artemia* spp., en hægt er að bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Greina skal fóður í flögum, sem fæst á almennum markaði, reglulega m.t.t. aðskotaefna.

17. Svo fremi sem viðeigandi búskaparháttum er fylgt er ekki gerð krafa um sérstaka aðferðarlýsingu ræktunar. Til dæmis er hægt að ala japanskan rískarpa í 2 l tönkum með 240 fiskseiði í hverjum tanki þangað til 4 vikum eftir frjóvgun, þá er hægt að ala þá í 2 l tönkum með 10 fiska í hverjum tanki þangað til 8 vikum eftir frjóvgun en þá er þeim skipt upp í undaneldispör í 2 l tönkum.

Aðlögun og val á fiskum

18. Prófunarfiskur skal valinn úr einum rannsóknarstofustofni 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 (Aths: þetta aðlögunartímabil er ekki staðbundið tímabil á undan váhrifum). Mælt er með því að prófunarfiskur sé fenginn úr innanhússræktun því flutningur á fullvöxnum fiskum er streituvaldandi og getur haft áhrif á áreiðanlega hrygningu. Fóðra skal fiskinn tvisvar á dag á saltvatnsrækjulirfum allan eldistímann og meðan váhrifafasinn stendur yfir og bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Að lágmarki 42 undaneldispör (54 undaneldispör er þörf er á samanburði með leysi, að hluta til vegna skorts á rannsóknarsögulegum gögnum til að styðja notkun samanburðar án leysis eingöngu) eru talin nauðsynleg til að hefja þessa prófun til að tryggja fullnægjandi samhliða prófun. Þar að auki skal sannprófa að hvert undaneldispar af F0-kynslóðinni sé XX-XY (þ.e. eðlilegur fjöldi kynlitninga hjá hvoru kyni) til að komast hjá því að ekki séu með sjálfsprottnir XX hængar (sjá 39. lið).

19. Meðan aðlögunarfasinn stendur yfir skal skrá dauðsföll fiska í ræktuninni og beita eftirfarandi viðmiðunum í kjölfar 48 klst. tímabils meðan þeir koma sér fyrir:

— Dánartíðni meiri en 10% af ræktunarstofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: hafna skal allri lotunni.

— Dánartíðni milli 5% og 10% af stofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: aðlögun í sjö daga til viðbótar við tveggja vikna aðlögunartímabilið; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næstu sjö dögum: hafna skal allri lotunni.

— Dánartíðni innan við 5% af stofninum á sjö dögum fyrir flutning í prófunarkerfið: lotan er ásættanleg.

20. Ekki skal meðhöndla fiskinn við sjúkdómum á tveggja vikna aðlögunartímabilinu fyrir prófunina og meðan váhrifatímabilið stendur yfir og komast skal algerlega hjá sjúkdómsmeðferð ef unnt er. Ekki skal nota fisk með klínísk einkenni sjúkdóms í rannsóknninni. Viðhalda skal skrá yfir athuganir og hvers konar meðferðir sem varða sjúkdómsvarnir eða sjúkdóma meðan ræktunartímabilið fyrir prófunina stendur yfir.

21. Koma skal váhrifafasanum af stað með fullvöxnum fiskum með kynbundna tvíbreytni og erfðafræðilega kyngreindir úr rannsóknarstofubirgðum af dýrum sem eru kynþroska og ræktuð við 25 ± 2 °C. Fiskarnir skulu auðkenndir sem staðfest kynbótadýr (þ.e. sem hafa eignast lífvænleg afkvæmi) í vikunni fyrir váhrif. Þyngd einstakra fiska af hvoru kyni í öllum hópnum, sem er notaður í prófuninni, skal í upphafi prófunar haldið innan við ± 20% frá meðalþyngd sama kyns. Hlutaúrtak af fiskinum skal vegið fyrir prófunina til að áætla meðalþyngdina. Valinn fiskur skal vera a.m.k. 12 vikna eftir frjóvgun og þyngd hrygnanna skal vera ≥ 300 mg og hænganna ≥ 250 mg.

TILHÖGUN PRÓFUNAR

Prófunarstyrkleikar

22. Mælt er með að nota fimm íðefnastyrkleika ásamt samanburði eða samanburðum. Taka skal allar upplýsingaveitur með í reikninginn þegar styrkbil prófunarstyrkleika er valið, þ.m.t. megindleg vensl efnabyggingar og virkni, ályktun út frá byggingarlega hliðstæðum efnum, niðurstöður úr prófunum á fiskum, s.s. greiningar á bráðum eiturhrifum (kafli C.1 í þessum viðauka), skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum (kafli C.48 í þessum viðauka) og aðrar prófunaraðferðir, t.d. kaflar C.15, C.37, C.41, C.47 eða C.49 í þessum viðauka (21.–26. heimild) ef þeir liggja fyrir, eða ef nauðsyn krefur, úr skammtastærðaprófun sem getur náð yfir æxlunarfasa. Ef þörf krefur má framkvæma skammtastærðaprófun við svipuð skilyrði (vatnsgæði, prófunarkerfi, hleðsla dýra) og þau sem eru notuð við endanlega prófun. Ef notkun leysis er nauðsynleg og engin rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk er hægt að nota skammtastærðaprófun til að ákvarða hentugleika leysis. Hæsti prófunarstyrkur skal ekki fara yfir vatnsleysnina 10 mg/l eða 1/10 af miðgildisbanastyrk í 96 klst. (LC50) (27. heimild). Lægsti styrkurinn skal vera 10 til 100 sinnum lægri en hæsti styrkurinn. Notkun á fimm styrkleikum í þessari prófun gerir ekki einungis kleift að mæla tengsl milli skammts og svörunar heldur einnig minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) sem eru nauðsynlegir fyrir áhættumat í nokkrum reglukerfum eða lögsögum. Almennt er bilstuðullinn milli nafnstyrkleika prófunaríðefnisins milli aðliggjandi meðferðargilda ≤ 3.2.

Samhliða prófanir innan meðferðar- og samanburðarhópa

23. Nota skal að lágmarki sex hólf samhliða prófana á hvern prófunarstyrkleika (sjá 7. viðbæti). Meðan æxlunarfasinn stendur yfir (að F0-kynslóðinni undanskilinni) er samsetning samhliða prófunar tvöfölduð til að meta frjósemismátt og í hverri samhliða prófun er einungis eitt undaneldispar (sjá 42. lið).

24. Keyra skal samanburðarprófun með þynningarvatni og, ef þörf krefur, samanburðarprófun með leysi til viðbótar við prófunarstyrkleikana. Nota skal tvöfalt fleiri hólf samhliða prófana fyrir samanburðina til að tryggja viðeigandi tölfræðilegan styrk (þ.e. nota skal a.m.k. 12 samhliða prófanir fyrir samanburðina). Meðan æxlunarfasinn stendur yfir er fjöldi samhliða prófana í samanburðinum tvöfaldaður (þ.e. að lágmarki 24 samhliða prófanir og í hverri samhliða prófun er einungis eitt pörunarpar). Eftir æxlun skulu samhliða prófanir fyrir samanburðina ekki innihalda fleiri en 20 fósturvísa (fiska).

VERKFERLI

Upphaf prófunar

25. Fullvaxinn, kynþroska fiskur, sem er notaður til að koma F0-kynslóðinni af stað í prófuninni, er valinn á grundvelli tveggja viðmiðana: aldurs (yfirleitt meira en 12 vikum eftir frjóvgun en ekki er mælt með að fara yfir 16 vikur eftir frjóvgun) og þyngdar (skal vera ≥ 300 mg fyrir hrygnur og ≥ 250 mg fyrir hænga).

26. Pör hrygna og hænga sem uppfylla ofangreindar viðmiðanir eru flutt í stökum pörum í hvern tank samhliða prófunar, þ.e. 12 samhliða prófanir í samanburðum og 6 samhliða prófanir í íðefnameðferðum við upphaf prófunarinnar. Þessum tönkum er raðað í meðferð af handahófi (t.d. T1-T5 og samanburður) og samhliða prófun (t.d. A-L í samanburði og A-F í meðferð) og síðan komið fyrir í váhrifakerfi með viðeigandi flæði í hverjum tanki.

Váhrifaskilyrði

27. Fullfrágengna samantekt á prófunarmæliþáttum og skilyrðum er að finna í 3. viðbæti. Með því að fylgja þessum nákvæmu skilgreiningum ættu endapunktagildi samanburðarfiskanna að vera svipuð þeim sem eru tilgreind í 4. viðbæti.

28. Meðan prófunin stendur yfir skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig og hitastig í a.m.k. einu prófunarkeri í hverjum meðferðarhóp og samanburði. Þessar mælingar, að undanskildu hitastigi, skal a.m.k. framkvæma einu sinni í viku allt váhrifatímabilið. Meðalhiti vatns allan tímann meðan rannsóknin stendur yfir skal vera á bilinu 24 til 26 °C í allri prófuninni. Hitastigið skal mælt daglega allt váhrifatímabilið. pH-gildi vatnsins skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig. Samhliða prófanir innan meðferðar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkar hver annarri og meðferðarhópar innan prófunar skulu ekki vera tölfræðilega ólíkir hver öðrum (byggt á daglegum mælingum á hitastigi og að undanskildum stuttum frávikum).

Tími sem váhrif standa yfir

29. Í prófuninni standa váhrif á kynþroska fiska af F0-kynslóðinni yfir í þrjár vikur. Í viku 4, á u.þ.b. 24. degi, er F1-kynslóðinni komið á fót og undaneldispör af F0-kynslóðinni eru aflífuð á mannúðlegan hátt og þyngd og lengd skráð (sjá 34. lið). Þessu er fylgt eftir með því að láta F1-kynslóðina verða fyrir váhrifum í 14 vikur til viðbótar (samtals 15 vikur hjá F1-kynslóðinni) og F2-kynslóðina í tvær vikur fram að klaki. Heildartímalengd prófunarinnar er yfirleitt 19 vikur (þ.e. fram að klaki F2-kynslóðar). Tímalínur fyrir prófunina koma fram í töflu 2 og eru útskýrðar á ítarlegri hátt í 9. viðbæti.

Fóðrunarfyrirkomulag

30. Hægt er að fóðra fiskinn að vild á saltvatnsrækjum, *Artemia* spp. (24 klst. gamlar krabbalirfur), og bæta við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur. Fóður í flögum, sem fæst á almennum markaði, skal greint reglulega m.t.t. aðskotaefna, s.s. klórlífrænna varnarefna, fjölhringa, arómatískra vetniskolefna og fjölklóraðra bífenýla (PCB-efni). Forðast skal fóður með hækkuð gildi innkirtlavirkra efna (þ.e. plöntuestrógena) sem gætu teflt svörun rannsóknarinnar í tvísýnu. Fjarlægja skal óétið fóður og saurefni úr prófunarkerjunum eins og þörf krefur, t.d. með því að hreinsa botn hvers tanks vandlega með vökvasugu. Einnig skal þrífa hliðar og botn hvers tanks einu sinni eða tvisvar í viku (t.d. með því að skafa með spaða). Dæmi um fóðrunaráætlun er að finna í 5. viðbæti. Fóðurmagn byggist á fjölda fiska í hverri samhliða prófun. Þess vegna er dregið úr magni fóðurs ef dauðsföll verða í samhliða prófun.

Magngreiningar og mælingar

31. 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 prófunin stendur yfir er styrkur prófunaríðefnisins ákvarðaður með hæfilegu millibili, helst a.m.k. í hverri viku í einni samhliða prófun fyrir hvern meðferðarhóp, og skipt á milli samhliða prófana í sama meðferðarhópnum vikulega.

32. Meðan prófunin stendur yfir skal kanna streymi þynningar- og stofnlausnar með reglulegu millibili til samræmis við það (t.d. að lágmarki þrisvar í viku). Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrk prófunaríðefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligilda í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó annaðhvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum. Ef um er að ræða íðefni sem safnast merkjanlega upp í fiski geta prófunarstyrkleikarnir minnkað eftir því sem fiskurinn stækkar. Í slíkum tilvikum er mælt með því að endurnýjunartíðni prófunarlausnarinnar í hverju hólfi sé aðlöguð til að halda prófunarstyrkleikum eins stöðugum og unnt er.

Athuganir og mældir endapunktar

33. Mældir endapunktar eru m.a. frjósemismáttur, frjósemi, klak, vöxtur og lifun til að meta hugsanleg áhrif á stofninn. Einnig skal framkvæma atferlisathuganir daglega og skrá óvenjulegt atferli af öllu tagi. Aðrir endapunktar gangvirkis eru m.a. mRNA vítellógeníns í lifur eða vítellógenínprótíngildi (VTG) með ónæmismælingu (28. heimild), svipfarsleg kyneinkenni s.s. einkennandi totumyndun á raufarugga hænga, mat á kyni á grundvelli vefja úr kynkirtlum og vefjafræðilegt mat á nýrum, lifur og kynkirtli (sjá skrá yfir endapunkta í töflu 1). Allir þessir sértæku endapunktar eru metnir í tengslum við ákvörðun á erfðafræðilegu kyni einstaklingsins sem byggist á því hvort genið dmy, sem ákvarðar karlkyn japansks rískarpa, er fyrir hendi eða ekki (sjá 41. lið). Þar að auki er tíminn fram að hrygningu einnig metinn. Að auki er hægt að leiða út einföld svipfarsleg kynjahlutföll með því að nota upplýsingar úr talningu á raufaruggatotum til að skilgreina svipgerð einstakra japanska rískarpa sem annaðhvort karlkyns eða kvenkyns. Ekki er búist við að þessi prófunaraðferð greini smávægileg frávik frá því kynjahlutfalli sem búist er við vegna þess að tiltölulega fáir fiskar í hverri samhliða prófun koma ekki til með að veita nægan tölfræðilegan styrk. Meðan vefjameinafræðilegt mat stendur yfir er kynkirtillinn einnig metinn og mun öflugri greiningar til að meta svipfar kynkirtilsins í tengslum við erfðafræðilegt kyn eru framkvæmdar.

34. Megintilgangur þessarar prófunaraðferðar er að meta möguleg stofntengd áhrif prófunaríðefnis. Endapunktar gangvirkis (VTG, annars stigs kyneinkenni (SSC) og tiltekin vefjameinafræðileg áhrif á kynkirtla) geta einnig aðstoðað við að ákvarða hvort einhver áhrif af völdum innkirtlatruflandi efna komi fram. Þessir endapunktar gangvirkis geta þó einnig orðið fyrir áhrifum af altækum eiturhrifum og öðrum eiturhrifum. Af þessum sökum má einnig gera nákvæmt vefjameinafræðilegt mat á lifur og nýrum til að stuðla að betri skilningi á hvers konar viðbrögðum í endapunktum gangvirkisins. Ef þetta ítarlega mat er ekki framkvæmt skal þó samt sem áður skrá og gera grein fyrir stórsæjum afbrigðileika sem kemur í ljós meðan vefjameinafræðilegt mat stendur yfir.

Aflífun fiska á mannúðlegan hátt

35. Þegar váhrifum á F0-kynslóðina og F1-kynslóðina lýkur og þegar tekið er hlutaúrtak af svo til fullvöxnum fiskum skal aflífa fiskana með viðeigandi magni af svæfingarlausn (t.d. tríkaínmetansúlfónati, MS-222 (CAS-nr. 886-86-2), jafnað með 300 mg/l af NaHCO3 (natríumbíkarbónat, CAS-nr. 144-55-8) til að draga úr ertingu í slímhúð. Ef fiskar sýna merki um talsverðar þjáningar (mjög alvarlegar og hægt er að segja með vissu til um dauða þeirra) og eru taldir dauðvona skal svæfa og aflífa dýrin og meðhöndla það sem dánartölur í gagnagreiningunni. Ef fiskur er aflífaður vegna sjúkdómstilviks skal skrá það og gera grein fyrir því. Unnt er að geyma fiska til vefjameinafræðilegrar greiningar (fiskurinn er festur til að vefjameinafræðigreining sé möguleg), háð því hvenær í rannsókninni fiskurinn er aflífaður.

Meðhöndlun hrogna og fiskseiða

Söfnun hrogna frá undaneldispörum til að rækta næstu kynslóð

36. Söfnun hrogna fer fram á fyrsta degi (eða á fyrstu tveimur dögunum ef þörf krefur) í prófunarviku 4 til að fara úr F0-kynslóðinni í F1-kynslóðina og í prófunarviku 18 til að fara úr F1-kynslóðinni í F2-kynslóðina. Prófunarvika 18 samsvarar F1-kynslóðinni, fullvaxinn fiskur 15 vikum eftir frjóvgun. Mikilvægt er að fjarlægja öll hrogn úr hverjum tanki daginn áður en hrognasöfnun hefst til að tryggja að öll hrogn, sem er safnað frá undaneldispörum, séu úr einni hrygningu. Eftir hrygningu geyma japanskur rískarpahrygnur hrognin stundum nálægt þarfaganginum þangað til unnt er að losa þau á undirlag. Ef ekkert undirlag er fyrir hendi í tanknum eru hrognin annaðhvort áföst hrygnunum eða á botni tanksins. Annaðhvort eru hrognin fjarlægð varlega af hrygnunni eða sogin upp frá botninum, allt eftir staðsetningu þeirra, í prófunarviku 4 hjá F0-kynslóðinni og prófunarviku 18 hjá F1-kynslóðinni. Öll hrogn sem er safnað innan meðferðar eru hópuð áður en þeim er dreift í ræktunarhólf.

37. Fjarlægja skal hrognaþræðina (e. *egg filament*) sem halda hrognum í goti saman. Frjóvguðum hrognum (allt að 20) er safnað frá hverju undaneldispari (eitt par í hverri samhliða prófun), þau eru hópuð innan meðferðar og þeim dreift á kerfisbundinn hátt í hentug ræktunarhólf (6. og 7. viðbætir). Með krufningarsmásjá af góðum gæðum er hægt að sjá merki um snemmbúna frjóvgun/þroskun, s.s. að frjóvgunarhimnan (æðabelgurinn) þykknar, áframhaldandi frumuskiptingu eða að kímblaðra myndast. Setja má ræktunarhólfin í aðskilið „ræktunarker“ sem er sett upp fyrir hverja meðferð (í því tilviki verður að mæla vatnsgæðabreytur og styrk prófunaríðefnis í þeim) eða í ker samhliða prófunar þar sem klakin seiði (t.d. kviðpokaseiði) verða geymd. Ef þörf er á öðrum söfnunardegi fyrir hrogn (prófunardagur 23) skal hópa öll hrognin frá báðum dögunum og dreifa þeim síðan á kerfisbundinn hátt í hverja samhliða prófun meðferðarinnar.

Eldi hrogna að klaki

38. Frjóvguð hrogn eru hrist stöðugt, t.d. í hrognaræktunarkassanum, með loftbólum eða með því að láta hann sveiflast lóðrétt. Dánartíðni hjá frjóvguðum hrognum (fósturvísum) er athuguð og skráð daglega. Dauð hrogn eru fjarlægð úr ræktunarkössunum (9. viðbætir). Á 7. degi eftir frjóvgun er hristingunni hætt eða dregið úr henni þannig að frjóvguðu hrognin setjast á botninn í ræktunarkassanum. Þetta ýtir undir klak, yfirleitt á næstu einum til tveimur dögum. Nýklakin hrogn (ungseiði; kviðpokaseiði) eru talin (á grundvelli hópaðra samhliða prófana) fyrir hverja meðferð og samanburð. Frjóvguð hrogn sem hafa ekki klakist út þegar tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn er liðinn í samanburðarhópnum (yfirleitt 16 eða 18 vikum eftir frjóvgun) teljast ólífvænleg og er fleygt.

39. Tólf nýklakin hrogn eru flutt í hvern tank samhliða prófunar. Nýklöktu hrognin úr ræktunarhólfunum eru hópuð og þeim dreift á kerfisbundinn hátt í tanka samhliða prófana (7. viðbætir). Þetta er hægt að gera með því að velja nýklakin hrogn af handahófi úr hópun fyrir meðferð og setja þau raðbundið og tilviljanakennt í ker samhliða prófana. Hver tankur skal innihalda sama fjölda (n=12) af klöktum seiðum (að hámarki 20 seiði í hverjum). Ef nýklöktu hrognin eru ekki nógu mörg til að fylla allar samhliða prófanir fyrir meðferð er mælt með að tryggja að eins margar samhliða prófanir og unnt er innihaldi 12 nýklakin hrogn. Hægt er að meðhöndla nýklakin hrogn á öruggan hátt með glerpípettum með stóru opi. Öll nýklakin viðbótarhrogn eru aflífuð á mannúðlegan hátt með svæfingarlyfi. Á þessum fáu vikum áður en undaneldispörin eru sett saman skal skrá þann dag þegar fyrsta hrygningin á sér stað í hverri samhliða prófun.

Undaneldispör sett saman

Uggaklipping og ákvörðun á arfgerðarlegu kyni

40. Ákvörðun á arfgerðarlegu kyni með uggaklippingum er gerð 9–10 vikum eftir frjóvgun (þ.e. í prófunarviku 12–13 hjá F1-kynslóðinni). Allir fiskar í einum tanki eru aflífaðir (með því að nota viðurkenndar aðferðir, t.d. IACUC) og lítið vefjasýni tekið úr enda sporðuggans, annaðhvort baklægt eða kviðlægt, á hverjum fiski til að ákvarða arfgerðarlegt kyn einstaklingsins (29. heimild). Hægt er að halda fiskum úr samhliða prófun í litlum búrum, einum í hverju búri ef unnt er, í tanki samhliða prófunar. Að öðrum kosti er hægt að halda tveimur fiskum í hverju búri ef það er unnt að þekkja þá í sundur. Ein aðferð gengur út á að skera sporðuggann á mismunandi hátt (t.d. endann baklægt eða endann kviðlægt) þegar vefjasýnið er tekið.

41. Arfgerðarlegt kyn japansks rískarpa er ákvarðað með sanngreindu og raðgreindu geni (dmy-gen) sem er staðsett á Y-litningnum. Ef dmy-gen er fyrir hendi bendir það til XY-einstaklings, óháð svipfari, en ef dmy-gen er ekki fyrir hendi bendir það til XX-einstaklings, óháð svipfari (30. og 31. heimild). Deoxýríbósakjarnsýra (DNA) er dregin út úr hverri uggaafklippu og hægt er að ákvarða hvort dmy-gen er fyrir hendi eða ekki með kjarnsýrumögnunaraðferðum (flettið upp í 9. viðbæti í kafla C.41 í þessum viðauka eða í 3. og 4. viðbæti í (29. heimild)).

Undaneldispörum komið upp

42. Upplýsingar um arfgerðarlegt kyn eru notaðar til að koma upp XX-XY-undaneldispörum, óháð ytra svipfari sem getur breyst vegna váhrifa frá prófunaríðefni. Daginn eftir að arfgerðarlegt kyn hvers fisks er ákvarðað eru tveir XX-fiskar og tveir XY-fiskar valdir af handahófi úr hverri samhliða prófun og tveimur XX-XY-undaneldispörum komið upp. Ef samhliða prófun inniheldur annaðhvort ekki tvo XX-fiska eða tvo XY-fiska skal sækja viðeigandi fisk úr annarri samhliða prófun innan meðferðarinnar. Það er í forgangi að vera með þann fjölda undaneldispara í samhliða prófun sem mælt er með (12. heimild) fyrir hverja meðferð og í samanburðunum. Fiskar með greinilegan afbrigðileika (sundmagavandamál, vanskapaðan hrygg, mjög mikinn breytileika í stærð o.s.frv.) eru undanskildir þegar undaneldispörum er komið upp. Meðan æxlunarfasi F1-kynslóðarinnar stendur yfir skal hver tankur samhliða prófunar einungis innihalda eitt undaneldispar.

Sýnataka úr svo til fullvöxnum fiskum og mat á endapunktum

Sýnataka úr fiskapörum sem eru ekki undaneldispör

43. Eftir að undaneldispörin eru sett saman eru fiskar, sem eru ekki valdir til áframhaldandi undaneldis, aflífaðir á mannúðlegan hátt til að mæla endapunkta hjá svo til fullvöxnum fiskum í prófunarviku 12–13 (F1-kynslóðin). Það er afar mikilvægt að fiskarnir séu meðhöndlaðir þannig að arfgerðarlegt kyn, sem var ákvarðað fyrir valið á undaneldispörunum, sé ennþá rekjanlegt til einstakra fiska. Öll gögn sem er safnað eru greind með tilliti til arfgerðarlegs kyns tiltekinna fiska. Hver fiskur er notaður í ýmsar mælingar á endapunktum, þ.m.t.: til að ákvarða lifunarhlutfall ungfiska/svo til fullvaxinna fiska (prófunarvikur 7–12/13 (F1-kynslóðin)), vöxt á lengdina (mæla má staðallengd ef sporðugginn var styttur vegna

sýnatöku til að greina erfðafræðilegt kyn. Unnt er að mæla heildarlengdina ef einungis hluti af raufarugganum, baklægt eða kviðlægt, er tekinn til að mæla dmy-gen) og líkamsþyngd (þ.e. blautvigt, þerraður), mRNA vítellógeníns í lifur (eða VTG) og raufaruggatotur (sjá töflur 1 og 2). Athygli er vakin á að einnig er gerð krafa um þyngd og lengd undaneldisparanna til að reikna út meðaltal í meðferðarhópi.

Sýnataka úr vef og vítellógenínmæling

44. Lifrin er krufin og skal geymd við ≤ – 70 °C þangað til mRNA vítellógeníns (eða VTG) er mælt. Sporður fisksins, þ.m.t. raufarugginn, er varðveittur í viðeigandi festiefni (t.d. Davidson) eða ljósmyndaður þannig að unnt sé að telja raufaruggatoturnar síðar. Ef þess er óskað má um leið taka sýni úr öðrum vefjum (þ.e. kynkirtlinum) og geyma. Styrkur VTG í lifur skal magngreindur með raðkvæmri ELISA-tækni (sjá verklagið sem mælt er með fyrir japanskan rískarpa í 6. viðbæti við kafla C.48 í þessum viðauka). Að öðrum kosti hafa aðferðir til að magnákvarða mRNA vítellógeníns, þ.e. mRNA útdrátt vtg I gensins úr lifrarsýni og magnákvarða fjölda afrita af vtg I-geninu (á hvert ng af mRNA samtals) með magnbundinni kjarnsýrumögnun, verið fastsettar hjá Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (U.S EPA) (29. heimild), Í staðinn fyrir að ákvarða fjölda afrita af vítellógenín-geninu í samanburðar- og meðferðarhópunum þarf færri úrræði við þá aðferð að ákvarða hlutfallslega breytingu (margfeldisbreytingu) á tjáningu vtg I-gensins úr samanburðar- og meðferðarhópunum og hún er ekki eins tæknilega erfið.

Annars stigs kyneinkenni

45. Við eðlilegar aðstæður eru einungis kynþroska japanskir rískarpahængar með totur, sem vaxa á liðflötum geisla raufaruggans sem annars stigs kyneinkenni, sem gefa hugsanleg lífmerki fyrir innkirtlatruflandi áhrif. Aðferð til að telja raufaruggatotur (fjölda liðflata með totur) er tilgreind í 8. viðbæti. Fjöldi raufaruggatota á hverjum einstaklingi er líka notuð til að flokka viðkomandi einstakling eftir ytra svipfari sem hæng eða hrygnu í þeim tilgangi að reikna út einfalt kynjahlutfall í hverri samhliða prófun. Japanskur rískarpi með fleiri raufaruggatotur en 0 er skilgreindur sem hængur, japanskur rískarpi með 0 raufaruggatotur er skilgreindur sem hrygna.

Frjósemismáttur og mat á frjósemi

46. Frjósemismáttur og frjósemi eru metin í prófunarvikum 1 til 3 hjá F0-kynslóðinni og í prófunarvikum 15 til 17 hjá F1-kynslóðinni. Hrognum er safnað daglega frá hverju undaneldispari í 21 dag samfellt. Hrognin eru fjarlægð varlega frá hrygnum í neti og/eða sogin upp af botninum á kerinu á hverjum morgni. Bæði frjósemismáttur og frjósemi eru skráð daglega hjá hverju undaneldispari í samhliða prófun. Frjósemismáttur er skilgreindur sem fjöldi hrogna sem er gotið og frjósemi er skilgreind á virkan hátt sem fjöldi frjóvgaðra og lífvænlegra hrogna þegar talið er. Talning skal gerð eins fljótt og unnt er eftir að hrognunum er safnað.

47. Frjósemismáttur í samhliða prófunum er skráður daglega sem fjöldi hrogna á hvert undaneldispar og greining gerð með tölfræðiaðferðum, sem mælt er með, með því að nota meðaltalið úr samhliða prófununum. Frjósemismáttur í samhliða prófunum er summan af fjölda frjórra hrogna, sem undaneldispar framleiðir, deilt með summu hrognafjöldans sem þetta par framleiðir. Tölfræðileg frjósemi er greind sem hlutfall í hverri samhliða prófun. Klakgeta í samhliða prófun er fjöldi nýklakinna hrogna deilt með fjölda hlaðinna fósturvísa (yfirleitt 20). Tölfræðilega séð er klakgetan greind sem hlutfall í hverri samhliða prófun.

Sýnataka úr fullvöxnum fiskum og mat á endapunktum

Sýnataka úr undaneldispörum fiska

48. Eftir prófunarviku 17 (þ.e. eftir að F2-kynslóðin er komin af stað á árangursríkan hátt) eru fullvaxnir fiskar af F1-kynslóðinni aflífaðir á mannúðlegan hátt og mismunandi endapunktar metnir (sjá töflur 1 og 2). Tekin er mynd af raufarugganum til að meta raufaruggatotur (sjá 8. viðbæti) og hann eða sporðurinn, rétt aftan við þarfagang, er fjarlægður og festur til að telja toturnar síðar. Taka má sýni úr hluta af sporðugganum þegar þarna er komið sögu og geyma hann til að sannprófa erfðafræðilegt kyn (dmy-gen) ef óskað er. Ef þörf krefur er hægt að taka vefjasýni til að endurtaka greininguna á dmy-geninu til að sannprófa erfðafræðilegt kyn tiltekins fisks. Líkamsholið er opnað til að gegnflæði viðeigandi festiefnis sé mögulegt (t.d. Davidson) áður en allur skrokkurinn er settur á kaf í festiefnið. Ef viðeigandi gegndræpisþrep er framkvæmt fyrir festingu þarf ekki að opna líkamsholið.

Vefjameinafræðileg rannsókn

49. Hver fiskur er metinn á vefjafræðilegan hátt m.t.t. sjúkdóma í kynkirtlavef (30. og 29. heimild). Eins og um getur í 33. lið geta aðrir endapunktar gangvirkis, sem eru metnir í þessari rannsókn (t.d. VTG, annars stigs kyneinkenni (SSC) og tiltekin vefjameinafræðileg áhrif á kynkirtla), orðið fyrir áhrifum af altækum eiturhrifum eða annars konar eiturhrifum. Af þessum sökum má einnig gera nákvæmt vefjameinafræðilegt mat á lifur og nýrum til að stuðla að betri skilningi á hvers konar viðbrögðum í endapunktum gangvirkisins. Ef þetta ítarlega mat er ekki framkvæmt skal þó samt sem áður skrá og gera grein fyrir stórsæjum afbrigðileika sem kemur í ljós meðan vefjameinafræðilegt mat stendur yfir. Það kemur til greina að „lesa niður“ frá meðferðarhópnum sem fékk hæsta styrkleikann (borið saman við samanburðinn) að meðferðarhóp án áhrifa en þó er mælt með að fletta upp í vefjameinafræðilegum leiðbeiningum (29. heimild). Yfirleitt eru öll sýnin unnin/sneidd og síðan les meinafræðingurinn úr þeim. Ef aðferðin „lesa niður“ er notuð skal bent á að í verkferli RSCABS-prófs (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) er þess vænst að eftir því sem skammtastærðir verða stærri aukist einnig líffræðilegu (meinafræðilegu) áhrifin. Þess vegna glatast styrkur ef einungis einn hár skammtur án nokkurra milliskammta er skoðaður. Ef tölfræðileg greining er ekki nauðsynleg til að ákvarða að hár skammtur hafi engin áhrif getur þessi aðferð verið ásættanleg. Svipfar kynkirtils er einnig leitt út frá þessu mati.

Aðrar athuganir

50. Framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) gefur af sér gögn sem hægt er að nota (t.d. í greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga) til að meta samtímis a.m.k. tvær almennar tegundir af ferli neikvæðra afleiðinga sem enda með skerðingu á æxlun: a) innkirtlatruflandi ferla sem fela í sér truflun á undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli; og b) ferla sem valda minnkandi lifun, vexti (lengd og þyngd) og æxlun með eiturhrifum sem hafa ekki áhrif á innkirtla. Endapunktar sem eru yfirleitt mældir í prófunum á langvinnum eiturhrifum, s.s. prófun á öllum lífsferlinum og prófun snemma á lífsferlinum, eru líka teknir með í þessa prófun og hægt er að nota þá til að meta hættu sem stafar frá bæði verkunarháttum eiturhrifaferla sem hafa ekki áhrif á innkirtla og innkirtlatruflandi eiturhrifaferlum. Meðan prófunin stendur yfir skal framkvæma atferlisathuganir daglega og óvenjulegt atferli af öllu tagi skal skráð. Þar að auki skal skrá öll dauðsföll og reikna út lifun fram til aflífunar fiska (prófunarvika 6/7), lifun eftir aflífunina fram til sýnatöku úr svo til fullvöxnum fiskum (9–10 vikum eftir frjóvgun) og lifun frá pörun fram til sýnatöku úr fullvöxnum fiskum.

Tafla 1

Yfirlit yfir endapunkta í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) (*)

Lífsstig	Endapunktur	Kynslóð
Fósturvísir (2 vikum eftir frjóvgun)	Klak (% og tími fram að klaki)	F1, F2
Ungfiskur (4 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
Svo til fullvaxinn (9 eða 10 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
	Vöxtur (lengd og þyngd)	
	Vítellógenín (mRNA eða prótín)	
	Annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur)	
	Ytra kynjahlutfall	
	Tími fram að fyrstu hrygningu	
Fullvaxinn (12–14 vikum eftir frjóvgun)	Æxlun (frjósemismáttur og frjósemi)	F0, F1
Fullvaxinn (15 vikum eftir frjóvgun)	Lifun	F1
	Vöxtur (lengd og þyngd)	
	Annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur)	
	Vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtill, lifur, nýru)	

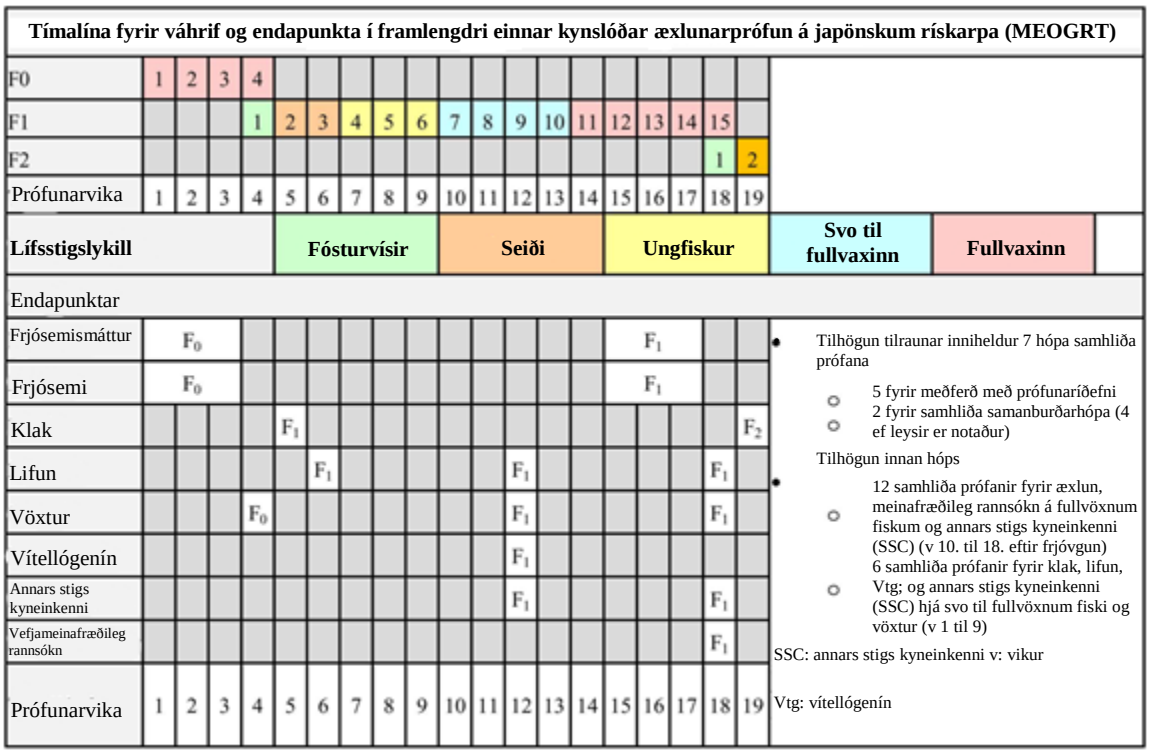
(*) Þessa endapunkta skal greina tölfræðilega

TÍMALÍNA

51. Tímalína fyrir framlengda einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT), sem er útlistuð í töflu 2, sýnir prófunina. Framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) tekur til váhrifa í 4 vikur á fullvaxna fiska af F0-kynslóðinni og váhrifa í 15 vikur á F1-kynslóðina og váhrifatímabils á F2-kynslóðina fram að klaki (2 vikum eftir frjóvgun). Starfsemi meðan framlengd einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) stendur yfir er tekin saman í 9. viðbæti.

Tafla 2

Tímalínur fyrir váhrif og mælingar á endapunktum í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT)



GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Tölfræðileg greining

52. Þar eð arfgerðarlegt kyn er ákvarðað fyrir alla prófunarfiska skal greina gögnin aðskilið m.t.t. hvors arfgerðarlegs kyns fyrir sig (þ.e. XY-hængar og XX-hrygnur). Sé það ekki gert kemur það til með að draga verulega úr tölfræðilegum styrk sérhverrar greiningar. Æskilegast er að tölfræðilegar greiningar á gögnunum séu samkvæmt aðferðum sem lýst er í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (32. heimild). Í 10. viðbæti eru frekari leiðbeiningar um tölfræðilega greiningu.

53. Tilhögun prófunar og val á tölfræðilegri prófun skulu veita nægilegan styrk til að greina breytingar á endapunktum sem hafa líffræðilega þýðingu ef gera skal grein fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (32. heimild). Skýrslugjöf um viðeigandi hrifstyrk og breytur getur verið háð regluramma. Tilgreina skal hundraðshlutfall breytinga á hverjum endapunkti sem er mikilvægt að greina eða áætla. Tilhögun tilraunar skal sniðin þannig að slíkt sé unnt. 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 er að finna í 10. viðbæti til að hjálpa til við meðferð gagna og við val á heppilegasta tölfræðiprófi eða líkaninu til að nota. Nota má aðrar tölfræðilegar aðferðir, að því tilskildu að þær séu vísindalega rökstuddar.

54. Nauðsynlegt er að greina breytileika innan hverrar samstæðu samhliða prófana með dreifnigreiningu eða aðferð með tengslatöflum og nota fullnægjandi, 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 prófi með stiglækkun (t.d. Jonckheere-Terpstra-prófi) fyrir stöðuga svörun. Ef gögn eru ekki í samræmi við einhalla styrkháða svörun skal nota Dunnett- eða Dunn-próf (eftir fullnægjandi vörpun gagna, ef nauðsyn krefur).

55. Að því er varðar frjósemismátt eru hrognin talin daglega en þau má greina sem samanlagðan fjölda hrogna eða sem endurteknar mælingar. Í 10. viðbæti er að finna nánari upplýsingar um hvernig á að greina þennan endapunkt. Að því er varðar vefjameinafræðileg gögn sem eru í formi alvarleikastigafjölda er búið að þróa nýtt tölfræðipróf, RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33. heimild).

56. Gera skal grein fyrir öllum endapunktum, sem koma í ljós í íðefnameðferðum, sem eru verulega frábrugðnir samsvarandi samanburðarprófunum.

Atriði varðandi gagnagreiningu

Notkun á ótryggum meðhöndlunarstigum

57. Tekið er tillit til margra þátta við ákvörðun á því hvort samhliða prófun eða heil meðhöndlun sýna augljós eiturhrif og skuli tekin úr greiningunni. Augljós eiturhrif eru skilgreind sem >4 dauðsföll í sérhverri samhliða prófun á bilinu 3 vikum eftir frjóvgun til 9 vikum eftir frjóvgun sem ekki er hægt að útskýra sem tæknilega villu. Önnur augljós merki eiturhrifa eru m.a. blæðing, óeðlilegt atferli, óeðlileg sundmynstur, lystarleysi og öll önnur klínísk einkenni sjúkdóms. Að því er varðar merki um næstum banvæn eiturhrif getur eigindlegt mat reynst nauðsynlegt og skal alltaf gert í tengslum við samanburðarhóp með þynningarvatni (einungis hreinu vatni). Ef augljós eiturhrif koma fram í meðferð(um) með hæsta styrkleikann/hæstu styrkleikana er mælt með því að þessar meðferðir séu felldar brott úr greiningunni.

Samanburður með leysi

58. Einungis skal líta á notkun leysis sem síðasta úrræði þegar allir aðrir íðefnagjafarmöguleikar hafa verið teknir til athugunar. Ef leysir er notaður skal samtímis keyra samanburð með þynningarvatni. Við lok prófunarinnar skal framkvæma mat á hugsanlegum áhrifum leysisins. Þetta er gert með tölfræðilegum samanburði á samanburðarhópnum með leysinum og samanburðarhópnum með þynningarvatninu. Mikilvægustu endapunktarnir til athugunar í þessari greiningu eru vaxtarákvörðunarþættir (þyngd) þar eð almenn eiturhrif geta haft áhrif á þá. Ef tölfræðilega marktækur munur kemur fram milli þessara endapunkta í samanburðarhópunum með þynningarvatni og samanburðarhópunum með leysi skal nota besta sérfræðiálit til að ákvarða hvort gildi prófunarinnar er teflt í tvísýnu. Ef það er munur á samanburðarhópunum tveimur skal bera meðferðina sem varð fyrir váhrifum af íðefninu saman við samanburðarhópinn með leysi nema vitað sé að samanburður við samanburðarhóp með þynningarvatni sé ákjósanlegri. Ef enginn tölfræðilega marktækur munur er milli samanburðarhópanna tveggja er mælt með því að meðferðir, sem verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, séu bornar saman við hópuð sýni (samanburðarhópar með leysi og samanburðarhópar með þynningarvatni) nema vitað sé að samanburður við annaðhvort samanburðarhópinn með leysi eða samanburðarhópinn með þynningarvatni sé ákjósanlegri.

Prófunarskýrsla

59. Eftirtalið skal vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni: eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar

— Efnafræðileg sanngreiningargögn.

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.

Prófunartegund:

— Vísindaheiti, stofn ef hann liggur fyrir, uppruni frjóvguðu hrognanna og aðferð við að taka þau og meðhöndlun eftir það.

Prófunarskilyrði:

— Ljóslota eða ljóslotur.

— Tilhögun prófunar (t.d. stærð hólfs, efni og rúmmál vatns, fjöldi prófunarhólfa og hólfa samhliða prófunar, fjöldi nýklaktra hrogna í hverri samhliða prófun).

— 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.

— Nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mæligilda og staðalfrávik þeirra.

— Gæði vatns í prófunarkerjum, sýrustig, hitastig (daglega) og styrkur uppleysts súrefnis.

— Nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruna, magn sem er gefið og hve oft er gefið).

Niðurstöður:

— Sannanir fyrir því að samanburðir uppfylli gildisviðmiðanir í heild sinni.

— Gögn um samanburðinn (ásamt samanburði með leysi þegar hann er notaður) og meðferðarhópana sem hér segir, klak (klakgeta og tími fram að klaki) fyrir F1-kynslóðina og F2-kynslóðina, lifun eftir klak fyrir F1-kynslóðina, vöxtur (lengd og líkamsþyngd) fyrir F1-kynslóðina, arfgerðarlegt kyn og kynjaaðgreining (t.d. annars stigs kyneinkenni byggt á raufaruggatotum og vefjameinafræðilegu mati á kynkirtlum) fyrir F1-kynslóðina, svipfarslegt kyn fyrir F1-kynslóðina, annars stigs kyneinkenni (raufaruggatotur) fyrir F1-kynslóðina, mRNA vítellógeníns (eða VTG-prótín) fyrir F1-kynslóðina, vefjafræðilegt mat (kynkirtill, lifur og nýru) fyrir F1-kynslóðina og æxlun (frjósemismáttur og frjósemi) fyrir F0-kynslóðina og F1-kynslóðina (sjá töflur 1 og 2).

— Aðferð við tölfræðilega greiningu (aðhvarfsgreining eða dreifnigreining) og meðhöndlun gagna (tölfræðipróf og líkön sem eru notuð).

— Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) fyrir hverja svörun sem metin er.

— Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) fyrir hverja svörun sem er metin (við p = 0,05); ECx 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 þessari prófunaraðferð og frávik frá samþykktarviðmiðunum og atriði sem varða mögulegar afleiðingar á niðurstöðu prófunarinnar.

60. Að því er varðar niðurstöður mælinga á endapunktum skal leggja fram meðalgildi og staðalfrávik þeirra (bæði á grundvelli samhliða prófana og styrks, ef unnt er).

HEIMILDIR

1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (Oryzias Latipes). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (Oryzias Latipes). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (Oryzias Latipes). Chemosphere 47: 71–80.

8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (Oryzias Latipes). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (Oryzias Latipes). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (Oryzias latipes) Exposed to 17ß-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (Oryzias latipes) Exposed to 17ß-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (Oryzias Latipes). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Aðgengilegt á: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (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.

15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. US EPA/600/3-91/064.

18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (Oryzias Latipes). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

21) Kafli C.15 í þessum viðauka, Fiskur, prófun á skammvinnum eiturhrifum á fósturvísis- og kviðpokastigi.

22) Kafli C.37 í þessum viðauka, Rannsókn á fiskum í 21 dag: skammtímaskimun fyrir estrógen- og andrógenvirkni og arómatasahömlun.

23) Kafli C.41 í þessum viðauka, Prófun á kynþroska fiska.

24) Kafli C.48 í þessum viðauka, Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum.

25) Kafli C.47 í þessum viðauka, Eiturhrifaprófun á fiskum á fyrri stigum lífs.

26) Kafli C.49 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska.

27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish In Vivo Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka Oryzias Latipes. Genetics 163: 245–251.

31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, Oryzias Latipes: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Íðefni: Efni eða blanda.

ELISA: ELISA-prófun.

Frjósemismáttur = fjöldi hrogna

Frjósemi = fjöldi lífvænlegra hrogna/frjósemismáttur

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)

Klakgeta = nýklakin hrogn/fjöldi fósturvísa sem var hlaðið í ræktunarkassa

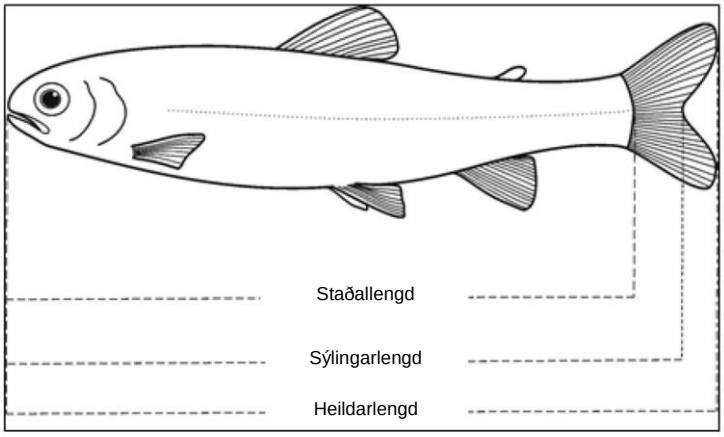
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

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



Mynd 1: Lýsing á mismunandi lengdum sem notaðar eru

ECx: (Hrifstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC50 sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

Prófun með samfelldu streymi er prófun með samfelldu streymi prófunarlausna gegnum prófunarkerfið meðan váhrif standa yfir.

UHK-öxull (e. *HPG axis*): Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull.

IUPAC: Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

Hleðsluhlutfall: Blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns.

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.

Miðgildisbanastyrkur (LC50): Styrkur prófunaríðefnis sem talinn er banvænn fyrir 50% prófunarlífveranna meðan prófunin stendur yfir.

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.

SMILES: SMILES-kerfið.

Þéttleiki: Fjöldi fiska miðað við rúmmál vatns.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Vítellógenín (VTG): Vítellógenín er fosfólípóglýkóprótínforefni eggjarauðuprótíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggbærum tegundum.

WPF: Vikur eftir frjóvgun (Weeks post fertilisation).

2. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	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

3. viðbætir

PRÓFUNARSKILYRÐI FYRIR FRAMLENGDA EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUN Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)

1. Ráðlögð tegund	Japanskur rískarpi (*Oryzias latipes*)
2. Tegund prófunar	Samfellt gegnumstreymi
3. Vatnshitastig	Nafnprófunarhitastig er 25 °C. Meðalhitastig í hverjum tanki meðan prófunin stendur yfir er 24–26 °C.
4. Lýsing	Flúrperur (breitt róf og ~150 lúmen/m2)(~150 lúx).
5. Ljóslota	Birta í 16 klst., myrkur í 8 klst.
6. Hleðsluhlutfall	F0-kynslóðin: 2 fullvaxnir/samhliða prófun; F1-kynslóð komið af stað með að hámarki 20 hrognum (fósturvísar)/samhliða prófun, fækkað í 12 fósturvísa/ samhliða prófun við klak, síðan 2 fullvaxnir (XX-XY undaneldispar) 9–10 vikum eftir frjóvgun fyrir æxlunarfasann.
7. Minnsta nothæfa rúmmál prófunarhólfs	1,8 l (t.d. stærð prófunarhólfs: 18x9x15 cm)
8. Rúmmálsútskipti prófunarlausna	Að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjanir/dag og allt að 16 rúmmálsendurnýjanir/ dag (eða streymi 20 ml/mín).
9. Aldur prófunarlífvera við upphaf	F0-kynslóðin: > 12 vikum eftir frjóvgun en mælt er með að þær fari ekki yfir 16 vikur eftir frjóvgun.
10. Fjöldi lífvera í hverri samhliða prófun	F0-kynslóðin: 2 fiskar (par með hæng og hrygnu); F1-kynslóðin að hámarki 20 fiskar (hrogn)/samhliða prófun (koma frá undaneldispörum af F0-kynslóðinni og F1-kynslóðinni).
11. Fjöldi meðferða	5 prófunaríðefnameðferðir auk viðeigandi samhliða prófunar eða prófana.
12. Fjöldi samhliða prófana á hverja meðferð	Að minnsta kosti 6 samhliða prófanir á hverja prófunaríðefnameðferð og a.m.k. 12 samhliða prófanir fyrir samanburð og fyrir samanburð með leysi, ef hann er notaður (fjöldi samhliða prófana er tvöfaldaður innan æxlunarfasans hjá F1-kynslóðinni).
13. Fjöldi lífvera á hverja prófun	Að minnsta kosti 84 fiskar í F0-kynslóðinni og 504 í F1-kynslóðinni (Ef samanburður með leysi er notaður verða það 108 fiskar í F0-kynslóðinni og 648 fiskar í F1-kynslóðinni). Einingin, sem er talin, eru seiðin eftir kviðpokastigið.
14. Fóðrunarfyrirkomulag	Fiskurinn er fóðraður að vild á saltvatnsrækjum, *Artemia* spp. (24 klst. gamlar krabbalirfur), og bætt við fóðri í flögum, sem fæst á almennum markaði, ef nauðsyn krefur (dæmi um fóðrunaráætlun til að tryggja fullnægjandi vöxt og þroskun til að styðja kröftuga æxlun er að finna í 5. viðbæti).
15. Loftun	Engin nema uppleyst súrefni nálgist <60% af mettunargildi lofts.
16. Þynningarvatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn.

17. Váhrifatímabil	Alla jafna 19 vikur (frá F0-kynslóð þangað til F2-kynslóðin klekst út).
18. Líffræðilegir endapunktar (aðal)	Klakgeta (F1-kynslóðin og F2-kynslóðin); lifun (F1-kynslóðin, frá klaki til 4 vikum eftir frjóvgun (endir seiðastigs/upphaf ungfiskastigs), 4 til 9 (eða 10) vikum eftir frjóvgun (upphaf ungfiskastigs fram að svo til fullvaxinn) og 9 til 15 vikum eftir frjóvgun (svo til fullvaxinn fram að aflífun fullvaxinna); vöxtur (F1-kynslóðin, lengd og þyngd 9 og 15 vikum eftir frjóvgun); annars stigs kyneinkenni (F1-kynslóðin, raufaruggatotur 9 og 15 vikum eftir frjóvgun); vítellógenín (F1-kynslóðin, mRNA vítellógeníns eða VTG-prótín 15 vikum eftir frjóvgun); svipfarslegt kyn (F1-kynslóðin með vefjafræðilegu mati á kynkirtlum 15 vikum eftir frjóvgun); æxlun (F0-kynslóðin og F1-kynslóðin, frjósemismáttur og frjósemi í 21 dag); tími fram að hrygningu (F1-kynslóðin) og vefjameinafræðileg rannsókn (F1-kynslóðin, kynkirtill, lifur og nýru 15 vikum eftir frjóvgun).
19. Gildisviðmiðanir prófunar	Uppleyst súrefni ≥ 60% mettunargildi lofts; meðalvatnshitastig 24–26 °C meðan prófunin stendur yfir; æxlunarárangur ≥ 65% hjá hrygnum í samanburðarhóp(um); meðaltal daglegs frjósemismáttar ≥ 20 hrogn í samanburðarhóp(um); klakgeta ≥ 80% (meðaltal) í samanburðum (í hvorum um sig af F1-kynslóðinni og F2-kynslóðinni); lifun eftir klak þangað til 3 vikum eftir frjóvgun ≥ 80% (meðaltal) og frá 3 vikum eftir frjóvgun þangað til kynslóðin hefur verið aflífuð ≥ 90% (meðaltal) í samanburðarhópunum (F1-kynslóðin), styrkleika prófunaríðefnis í lausn skal viðhaldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligildanna.

4. viðbætir

LEIÐBEININGAR UM DÆMIGERÐ SAMANBURÐARGILDI

Það skal bent á að þessi samanburðargildi byggjast á takmörkuðum fjölda fullgildingarrannsókna og kunna að taka breytingum í ljósi frekari reynslu.

Vöxtur

Lengdar- og þyngdarmælingar eru gerðar á öllum fiskum sem sýni eru tekin úr 9 (eða 10) og 15 vikum eftir frjóvgun. Ef þessari aðferðarlýsingu er fylgt má vænta þess að blautvigt 9 vikum eftir frjóvgun sé 85–145 mg hjá hængum og 95–150 mg hjá hrygnum. Sú þyngd sem vænst er 15 vikum eftir frjóvgun er 250–330 mg hjá hængum og 280–350 mg hjá hrygnum. Þó að það geti verið veruleg frávik frá þessum bilum hjá einstaka fiskum bendir meðalþyngd í samanburði, sem er verulega langt frá þessum bilum, einkum ef hún er minni, til vandkvæða við fóðrun, hitastýringu, vatnsgæði, sjúkdóma eða hvers konar samsetningu þessara þátta.

Klak

Árangur í klaki í samanburðum er yfirleitt í kringum 90% en þó eru gildi alveg niður í 80% ekki óalgeng. Árangur í klaki sem fer undir 75% getur bent til ófullnægjandi hristings á hrognum í þroskun eða ónógrar varkárni við meðhöndlun hrognanna, s.s. að dauð hrogn hafi ekki verið fjarlægð tímanlega sem leiddi til sveppasýkingar.

Lifun

Lifunarhlutfall fram að 3 vikum eftir frjóvgun frá klaki og eftir 3 vikur eftir frjóvgun er yfirleitt 90% eða meiri í samanburðarhópum en allt niður í 80% lifunarhlutfall í samanburðarhópum snemma á lífsferlinum er ekki áhyggjuefni. Innan við 80% lifunarhlutfall í samanburðarhópum gæti gefið tilefni til áhyggna og getur bent til ófullnægjandi hreinsunar kersins sem leiðir til þess að fiskseiði tapast vegna sjúkdóms eða kafna vegna lítils hlutfalls af uppleystu súrefni. Dauðsföll geta líka orðið í tengslum við meiðsli þegar tankurinn er hreinsaður og ef fiskseiði tapast ofan í niðurfallskerfi tanksins.

Vítellógenín-gen

Þó að raungildi vítellógenín-gensins (vtg), gefið upp sem afrit/ng af mRNA samtals, geti verið mjög mismunandi milli rannsóknarstofa vegna verkferla eða tækjabúnaðar sem er notaður skal hlutfall vítellógeníns vera u.þ.b. 200-falt meira í hrygnum í samanburðarhóp en hjá hængum í samanburðarhóp. Það er ekki óalgengt að þetta hlutfall sé allt að 1000 til 2000, þó eru hlutföll sem eru undir 200 grunsamleg og geta bent til vandkvæða í tengslum við mengun sýnis eða vandkvæða varðandi verkferli og/eða prófefni sem eru notuð.

Annars stigs kyneinkenni

Að því er varðar hænga er eðlilegt bil milli annars stigs kyneinkenna, skilgreint sem heildarfjöldi hluta í geislunum á raufarugganum sem eru með totur, 40–80 hlutar 9–10 vikum eftir frjóvgun. Um 15 vikum eftir frjóvgun skal bilið hjá hængum í samanburðarhópnum vera u.þ.b. 80–120 og 0 hjá hrygnum. Í sjaldgæfum tilvikum eru af óútskýrðum ástæðum engar totur á sumum hængum 9 vikum eftir frjóvgun en þar eð totur vaxa á öllum hængum í samanburðarhópum eigi síðar en 15 vikum eftir frjóvgun stafar þetta líklega af seinkaðri þroskun. Ef hrygnur í samanburðarhóp eru með totur bendir það til þess að XX-hængar séu í stofninum.

XX-hængar

Eðlileg bakgrunnstíðni XX-hænga í rækt virðist vera u.þ.b. 4% eða minna við 25 °C en tíðnin eykst við hækkandi hitastig. Gera skal ráðstafanir til að lágmarka hlutfall XX-hænga í stofninum. Þar eð tíðni XX-hænga virðist hafa erfðafræðilegan þátt og er því arfgeng er það áhrifarík leið til að draga úr tíðni XX-hænga í stofninum að vakta ræktunarstofninn og tryggja að XX-hængar séu ekki notaðir til að fjölga í ræktunarstofninum.

Hrygningarvirkni

Hrygningarvirkni í samhliða prófunum fyrir samanburðina skal vöktuð daglega áður en mat á frjósemismætti er innt af hendi. Hægt er að gera eigindlegt sjónrænt mat á samanburðarpörunum til að sjá merki um hrygningarvirkni. Flest pör í samanburðinum ættu að hrygna 12–14 vikum eftir frjóvgun. Ef pör sem hrygna eru fá á þessum tímapunkti bendir það til mögulegra vandkvæða í tengslum við heilbrigði, þroskun eða velferð fiskanna.

Frjósemismáttur

Heilbrigður, vel fóðraður japanskur rískarpi 12–14 vikum eftir frjóvgun hrygnir alla jafna daglega og framleiðir á bilinu 15 til 50 hrogn á dag. Hrognaframleiðsla hjá 16 af þeim 24 undaneldispörum í samanburðinum sem mælt er með (> 65%) skal vera meiri en 20 hrogn á dag og má fara í allt að 40 hrogn á dag. Minna magn en þetta getur bent til óþroskaðra, vannærðra eða óheilbrigðra hrygningarpara.

Frjósemi

Hundraðshluti frjórra hrogna hjá hrygningarpörum í samanburðinum er yfirleitt í kringum 90% og gildi sem eru 95% og hærri eru ekki óalgeng. Frjósemishlutfall hrogna í samanburðarhópnum sem er undir 80% er grunsamlegt og getur annaðhvort bent til óheilbrigðra einstaklinga eða að skilyrðin í ræktuninni séu ekki eins og best er á kosið.

5. viðbætir

DÆMI UM FÓÐRUNARÁÆTLUN

Dæmi um fóðrunaráætlun til að tryggja fullnægjandi vöxt og þroskun til að styðja kröftuga æxlun er að finna í töflu 1. Frávik frá þessari fóðrunaráætlun geta verið ásættanleg en mælt er með að gerðar séu prófanir á þeim til að sannreyna að hægt sé að sjá ásættanlegan vöxt og æxlun. Í því skyni að fylgja tillagðri fóðrunaráætlun þarf að ákvarða þurrvigt saltvatnsrækju miðað við rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar áður en prófunin hefst. Þetta er hægt að gera með því að vega skilgreint rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar sem hefur verið þurrkuð í 24 klst. við 60 °C í forvigtuðum skálum. Til að gera ráð fyrir þyngd saltsins í fljótandi lausninni skal einnig þurrka og vigta sama magn af sömu saltlausn og notuð er í fljótandi lausninni og draga það frá þyngd þurrkaðrar fljótandi saltvatnsrækjulausnar. Að öðrum kosti er hægt að sía saltvatnsrækjuna og hreinsa hana með eimuðu vatni fyrir þurrkun og útiloka þar með þörfina á að vigta þyngd „saltblanka“. Þessar upplýsingar eru notaðar til að umreikna upplýsingarnar í töflunni úr þurrvigt saltvatnsrækju yfir í rúmmál fljótandi saltvatnsrækjulausnar, sem á að fóðra fiskana á, á hvern fisk. Að auki er mælt með því að deiliskammtar af fljótandi saltvatnsrækjulausninni séu vigtaðir vikulega til að sannreyna að fóðrað sé með réttri þurrvigt saltvatnsrækjunnar.

Tafla 1

Dæmi um fóðrunaráætlun

Tími (eftir klak)	Saltvatnsrækja (mg þurrvigt/fiskur/dag)
Dagur 1	0,5
Dagur 2	0,5
Dagur 3	0,6
Dagur 4	0,7
Dagur 5	0,8
Dagur 6	1,0
Dagur 7	1,3
Dagur 8	1,7
Dagur 9	2,2
Dagur 10	2,8
Dagur 11	3,5
Dagur 12	4,2
Dagur 13	4,5

Tími (eftir klak)	Saltvatnsrækja (mg þurrvigt/fiskur/dag)
Dagur 14	4,8
Dagur 15	5,2
Dagur 16–21	5,6
Vika 4	7,7
Vika 5	9,0
Vika 6	11,0
Vika 7	13,5
Vika 8–aflífunar	22,5

6. viðbætir

DÆMI UM HROGNARÆKTUNARHÓLF

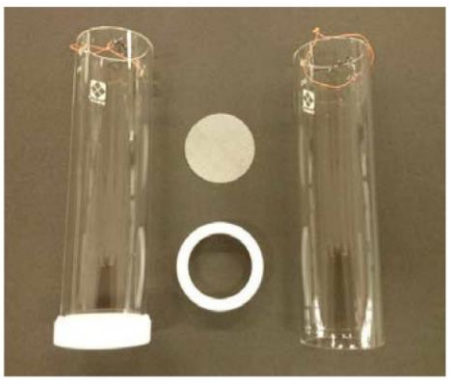
Dæmi A

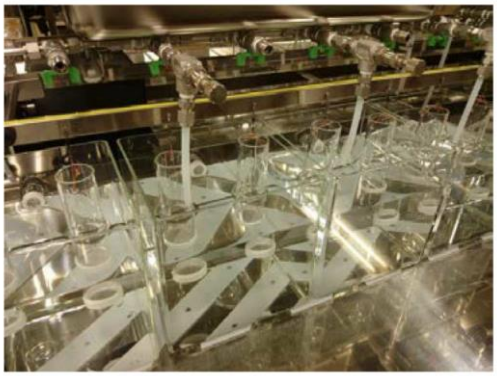




Þessi ræktunarkassi samanstendur af þverskornu skilvinduglasi úr gleri, tengd með slíf úr ryðfríu stáli og haldið á sínum stað með skrúfuðum tappa skilvinduglassins. Litlu röri úr gleri eða ryðfríu stáli er stungið gegnum tappann og staðsett nálægt hvelfdum botninum, úr því er lofti blásið varlega til að halda hrognunum á floti og þannig dregið úr því að rotverusveppasýking flytjist milli hrognanna ásamt því að íðefnaskiptin milli ræktunarkassans og eldistanksins verða auðveldari.

Dæmi B





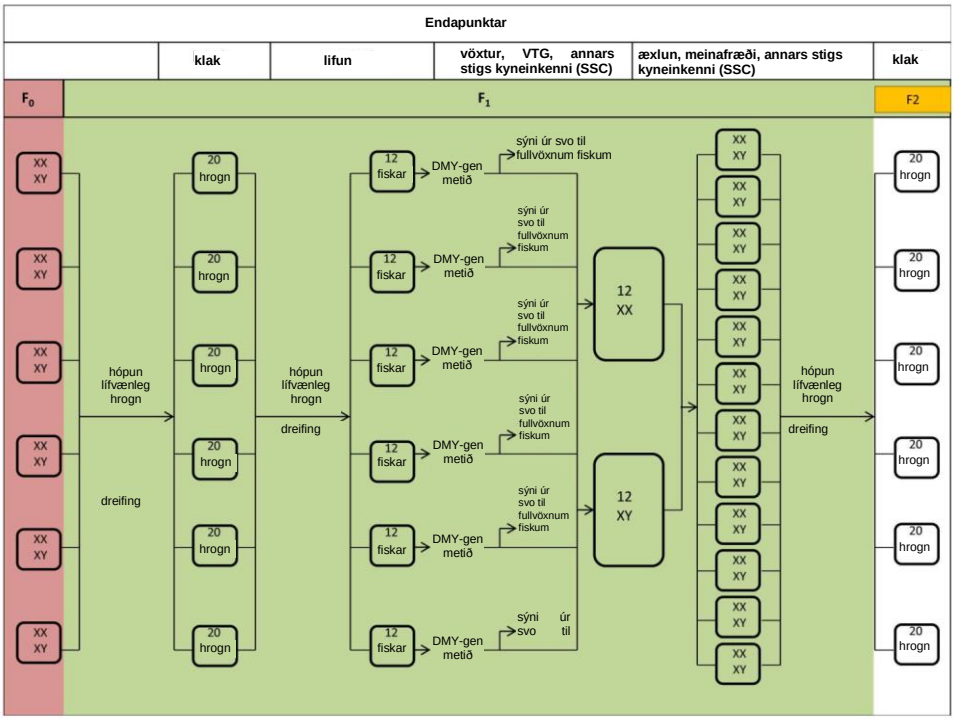
Þessi ræktunarkassi samanstendur af glersívalningi (5 cm að þvermáli og 10 cm á hæð) og ryðfríu vírneti (0.25 φ og 32 möskvar) sem er fest við botninn á sívalningnum með hring úr pólýtetraflúoretýleni. Ræktunarkassarnir hanga neðan úr lyftislá (e. *lifting bar*) á tönkunum og eru hristir lóðrétt (u.þ.b. 5 cm sveifluvídd) í viðeigandi lotu (u.þ.b. á 4 sekúndna fresti) að því er varðar hrogn úr japönskum rískarpa.

7. viðbætir

SKÝRINGARMYND YFIR HÓPUN OG SKIPTINGU Í SAMHLIÐA PRÓFANIR Í ALLRI FRAMLENGDU EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUNINNI Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)

Mynd 1

Hópun og endurskipting í samhliða prófanir í allri framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT). Myndin sýnir eina meðferð eða 1/2 samanburðarhóp. Vegna hópunar er auðkenni samhliða prófunar ekki það sama í allri prófuninni. Veita skal því athygli að hugtakið „hrogn“ á við um lífvænleg, frjóvguð hrogn (jafngildi fósturvísa).



Meðferðir og samhliða prófun.

Í prófunaraðferðinni er mælt með 5 prófunaríðefnameðferðum þar sem notað er efni af tæknilegum hreinleika og neikvæður samanburður. Fjöldi samhliða prófana í hverri meðferð helst ekki stöðugur í allri framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT) og fjöldi samhliða prófana í samanburðarmeðferðinni er tvöfalt fleiri en í einni prófunaríðefnameðferð. Að því er varðar F0-kynslóðina eru 6 samhliða prófanir í hverri prófunaríðefnameðferð en í neikvæðu samanburðarmeðferðinni eru 12 samhliða prófanir. Eindregið er ráðið frá því að nota leysi og ef hann er notaður skal rökstuðningur fyrir notkun leysisins og fyrir vali á leysi koma fram í skýrslunni um framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófunina á japönskum rískarpa (MEOGRT). Ef leysir er notaður er einnig nauðsynlegt að nota tvenns konar samanburð: a) samanburð með leysi og b) neikvæðan samanburð. Hvor þessara samanburðarhópa um sig skal samanstanda af heilu setti af samhliða prófunum á öllum stigum innan framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófunarinnar á japönskum rískarpa (MEOGRT). Meðan prófunarlífverur í F1-kynslóðinni þroskast (og í F2-kynslóðinni fram að klaki) helst þessi samhliða prófunaruppbygging eins. Á fullvaxna stiginu, þegar undaneldispör af F1-kynslóðinni eru sett saman, er þó ákjósanlegt að tvöfalda fjölda undaneldispara í samhliða prófunum í hverri meðferð; þess vegna eru allt að 12 pör samhliða prófunar í hverri prófunaríðefnameðferð og 24 pör samhliða prófunar í samanburðarhópnum (og önnur 24 pör samhliða prófunar í samanburði með leysi, ef þörf krefur). Klak fósturvísa, sem pör af F1-kynslóðinni hafa gotið, er rannsakað með sömu samhliða prófunaruppbyggingu og var notuð fyrir fósturvísana sem F0-kynslóðin gaut sem þýðir að í upphafi eru 6 samhliða prófanir á hverja prófunaríðefnameðferð og 12 samhliða prófanir í samanburðarhópnum eða -hópunum.

8. viðbætir

TALNING Á RAUFARUGGATOTUM

Helstu tæki og prófefni

— Krufningarsmásjá (með áfastri myndavél ef þess er óskað)

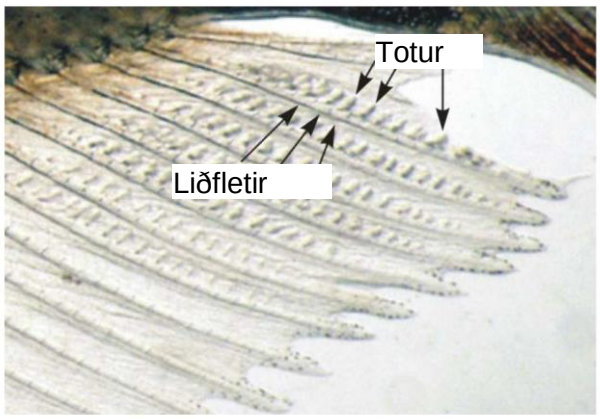
— Festiefni (t.d. Davidson (ekki er mælt með Bouin)) ef ekki er talið á mynd

Verkferli

Eftir krufningu skal taka mynd af raufarugganum til að auðvelt sé að telja raufaruggatoturnar. Þó að myndataka sé sú aðferð sem mælt er með er hægt að festa raufaruggann með Davidson-festiefni eða öðru viðeigandi festiefni í u.þ.b. 1 mínútu. Mikilvægt er að raufarugginn liggi flatur meðan hann er festur til að það sé auðveldara að telja raufaruggatoturnar. Hægt er að geyma skrokkinn með raufarugganum í Davidson-festiefni eða öðru viðeigandi festiefni fram að greiningu. Teljið fjölda liðflata (sjá **mynd 1**) með totur sem standa upp af aftari brún liðflatarins.

Mynd 1

Raufaruggatotur



9. viðbætir

NÁKVÆM TÍMALÍNA FYRIR FRAMLENGDA EINNAR KYNSLÓÐAR ÆXLUNARPRÓFUN Á JAPÖNSKUM RÍSKARPA (MEOGRT)

Prófunarvikur 1–3 (F0-kynslóðin)

Hrygningarpör af F0-kynslóðinni, sem hafa uppfyllt valviðmiðanirnar (sjá 16.–20. lið), eru látin verða fyrir váhrifum í þrjár vikur til að kynfrumur og kynkirtlavefur, sem eru að þroskast, verði fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu. Hver tankur samhliða prófunar hefur að geyma eitt undaneldispar (XX-hrygna XY-hængur undaneldispar). Hrognum í goti er safnað saman, þau talin og metin m.t.t. frjósemi í 21 dag samfellt sem hefst á prófunardegi 1.

Prófunarvika 4 (F0-kynslóðin og F1-kynslóðin)

Ákjósanlegt er að frjóvguðum og lífvænlegum hrognum (fósturvísum) sé safnað á einum degi; ef fósturvísar eru ekki nógu margir má þó safna þeim á tveimur dögum. Ef söfnunin stendur í tvo daga eru allir fósturvísar innan meðferða, sem var safnað fyrri daginn, hópaðir með þeim sem var safnað seinni daginn. Síðan er öllum hópuðu fósturvísunum í hverri meðferð dreift af handahófi í hvern ræktunarkassa samhliða prófunar með 20 fósturvísa í hverjum ræktunarkassa. Dánartíðni hjá frjóvguðum hrognum (fósturvísum) er athuguð og skráð daglega. Dauð hrogn eru fjarlægð úr ræktunarkössunum (dauði frjóvgaðra hrogna getur, einkum á fyrstu stigum, markast af greinileg minnkun á gagnsæi og litarbreytingu, einkum á fyrstu stigum, sem orsakast af kekkjun og/eða útfellingu prótína og veldur því að þau verða hvít og ógagnsæ OECD 2010).

Athugasemd: Ef annan söfnunardag þarf fyrir eina meðferð þarf að fylgja þessu verklagi í öllum meðferðum (þ.m.t. samanburðarprófanir). Ef ekki eru nógu margir fósturvísar innan meðferðar eftir annan söfnunardaginn til að hver ræktunarkassi sé hlaðinn með 20 fósturvísum skal fækka fjölda fósturvísa, sem er hlaðið innan þeirrar tilteknu meðferðar, niður í 15 fósturvísa í hvern ræktunarkassa. Ef ekki eru nógu margir fósturvísar til að hlaða hvern ræktunarkassa með 15 fósturvísum skal fækka fjölda ræktunarkassa sameiginlegra prófana þangað til fósturvísarnir duga til að setja 15 í hvern ræktunarkassa. Að auki er hægt að bæta fleiri undaneldispörum í hverja meðferð og samanburði í F0-kynslóðinni til að framleiða fleiri hrogn til að ná 20 í hverja samhliða prófun eins og mælt er með.

Á prófunardegi 24 eru undaneldispör af F0-kynslóðinni aflífuð á mannúðlegan hátt og þyngd og lengd skráð. Ef nauðsyn krefur má e.t.v. halda undaneldispörum af F0-kynslóðinni í 1–2 daga til viðbótar til að koma F1-kynslóðinni af stað aftur.

Prófunarvika 5–6 (F1-kynslóðin)

Einum til tveimur dögum áður en búist er við að klak hefjist skal hætta hristingi hrognanna í ræktuninni eða draga úr honum til að flýta fyrir klaki. Eftir því sem fósturvísarnir klekjast út daglega eru nýklakin hrogn hópuð eftir meðferð og dreift á kerfisbundinn hátt í hvern seiðatank samhliða prófunar innan tiltekinnar meðferðar með að hámarki 12 nýklakin hrogn í hverjum. Þetta er gert með því að velja nýklakin hrogn af handahófi og setja eitt hrogn í einu tilviljanakennt í hvern hóp samhliða prófunar og fara eftir röð samhliða prófunaríláta þangað til komin eru 12 nýklakin hrogn í hverja samhliða prófun innan meðferðar. Ef það eru ekki nógu mörg nýklakin hrogn til að fylla allar samhliða prófanir skal tryggja að það séu 12 nýklakin hrogn í eins mörgum samhliða prófunum og unnt er til að koma F1-kynslóðarfasanum af stað.

Hrogn sem hafa ekki klakist út þegar tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn í samanburðarhópnum er liðinn teljast ólífvænleg og er fleygt. Fjöldi nýklakinna hrogna er skráður og árangur í klaki (klakgeta) reiknaður út í hverri samhliða prófun.

Prófunarvikur 7–11 (F1-kynslóðin)

Lifun fiskseiða er athuguð og skráð daglega í öllum samhliða prófunum. Á prófunardegi 43 er fjöldi lifandi fiska í hverri samhliða prófun skráður sem og upphaflegur fjöldi nýklakinna hrogna sem voru sett í samhliða prófunina (að lágmarki 12). Þetta gerir það kleift að reikna út hundraðshlutfall lifunar frá klaki að því stigi þegar fiskurinn er svo til fullvaxinn.

Prófunarvika 12 (F1-kynslóðin)

Á prófunardegi 78–85 er tekið lítið sýni úr sporðugganum á hverjum fiski til að ákvarða arfgerðarlegt kyn einstaklingsins (þ.e. uggaklipping) að því er varðar hvern fisk. Þessar upplýsingar eru notaðar til að koma á undaneldispörum.

Innan þriggja daga frá því að arfgerðarlegt kyn hvers fisks er ákvarðað eru 12 undaneldispör í hverri meðferð og 24 pör í hverjum samanburði sett saman af handahófi. Tveir XX- og XY-fiskar úr hverri samhliða prófun eru valdir af handahófi og síðan hópaðir eftir kyni, þar næst valdir af handahófi til að koma á undaneldispörum (þ.e. XX-XY pari). Að lágmarki 12 samhliða prófunum á hverja íðefnameðferð og a.m.k. 24 samhliða prófunum fyrir samanburðinn er komið á með eitt undaneldispar í hverri samhliða prófun. Ef samhliða prófun inniheldur ekki annaðhvort tvo XX-fiska eða tvo XY-fiska, sem eru tiltækir til hópunar, skal fá fisk af viðeigandi arfgerðarkyni úr öðrum samhliða prófunum innan meðferðarinnar.

Fiskarnir sem eftir eru (að hámarki 8 fiskar í hverri samhliða prófun) eru aflífaðir á mannúðlegan hátt og tekin sýni til að meta mismunandi endapunkta svo til fullvaxinna fiska. Gögn um dmy-gen (XX eða XY) fyrir öll sýni úr svo til fullvöxnum fiskum eru geymd til að tryggja að hægt sé að tengja öll endapunktagögn við erfðafræðilegt kyn hvers fisks fyrir sig.

Prófunarvikur 13–14 (F1-kynslóðin)

Váhrifin halda áfram meðan svo til fullvaxin undaneldispör þroskast og verða fullvaxin. Á prófunardegi 98 (þ.e. daginn áður en söfnun hrogna hefst) eru hrognin fjarlægð, bæði úr kerinu og af hrygnunum.

Prófunarvikur 15–17 (F1-kynslóðin)

Hrognum í goti er safnað saman í 21 dag samfellt í hverri samhliða prófun og metin m.t.t. frjósemismáttar og frjósemi.

Prófunarvika 18 (prófunarvika 4 endurtekin) (F1-kynslóðin og F2-kynslóðin)

Að morgni prófunardags 120 er hrognum safnað í hverjum tanki samhliða prófunar. Hrogn sem er safnað eru metin og frjóvguð hrogn (hrognaþræðir fjarlægðir) frá hverju undaneldispari fyrir sig eru hópuð eftir meðferð og dreift á kerfisbundinn hátt í hrognaræktunarhólfin með 20 frjóvguð hrogn í hverjum ræktunarkassa. Setja má ræktunarkassana í aðskilda „ræktunartanka“ sem eru settir upp fyrir hverja meðferð, eða í tank samhliða prófunar sem kemur til með að innihalda klöktu seiðin eftir hrygningu. Ákjósanlegt er að fósturvísunum sé safnað á einum degi; ef fósturvísarnir eru ekki nógu margir má þó safna þeim á tveimur dögum. Ef söfnunin stendur í tvo daga eru allir fósturvísar innan meðferða, sem var safnað fyrri daginn, hópaðir með þeim sem var safnað seinni daginn. Síðan er öllum hópuðu fósturvísunum í hverri meðferð dreift af handahófi í hvern ræktunarkassa samhliða prófunar með 20 fósturvísa í hverjum ræktunarkassa. Athugasemd: Ef annan söfnunardag þarf fyrir eina meðferð þarf að fylgja þessu verklagi í öllum meðferðum (þ.m.t. samanburðarprófanir). Ef ekki eru nógu margir fósturvísar innan meðferðar eftir annan söfnunardaginn til að hver ræktunarkassi sé hlaðinn með 20 fósturvísum skal fækka fjölda fósturvísa, sem er hlaðið innan þeirrar tilteknu meðferðar, niður í 15 fósturvísa í hvern ræktunarkassa. Ef ekki eru nógu margir fósturvísar til að hlaða hvern ræktunarkassa með 15 fósturvísum skal fækka fjölda ræktunarkassa sameiginlegra prófana þangað til fósturvísarnir duga til að setja 15 í hvern ræktunarkassa.

Á prófunardegi 121 (eða prófunardegi 122 til að tryggja að F2-kynslóðinni hafi verið komið vel af stað) eru undaneldispör af F1-kynslóðininni aflífuð á mannúðlegan hátt og greining gerð m.t.t. endapunkta fullvaxinna fiska. Ef nauðsyn krefur má e.t.v. halda undaneldispörum af F1-kynslóðinni í 1–2 daga til viðbótar til að koma F2-kynslóðinni aftur af stað.

Prófunarvikur 19–20 (F2-kynslóðin)

Einum til tveimur dögum áður en búist er við að klak hefjist skal hætta hristingi hrognanna í ræktuninni eða draga úr honum til að flýta fyrir klaki. Ef prófuninni er hætt af því að klaki F2-kynslóðarinnar lýkur eru nýklöktu hrognin talin daglega og þeim fleygt. (Fósturvísar sem hafa ekki klakist eftir framlengdan ræktunartíma, skilgreindur sem tvöfalt lengri tími en miðgildisdagurinn í samanburðarhópnum, teljast ólífvænlegir).

10. viðbætir

TÖLFRÆÐILEG GREINING

Þær tegundir líffræðilega gagna sem verða til í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) eru ekki einkvæmar fyrir hana og margar viðeigandi tölfræðilegar aðferðir hafa verið þróaðar, nema fyrir meinafræðileg gögn, til að greina svipuð gögn á tilhlýðilegan hátt með hliðsjón af eiginleikum gagnanna, þ.m.t. normleiki, einsleitni dreifni, hvort hönnun rannsóknar opnar möguleika á tilgátuprófun eða aðhvarfsgreiningu, stikabundin próf eða óstikabundin próf o.s.frv. Almenn meginregla er sú að tillagða tölfræðilega greiningin fylgi ráðleggingum Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir visteiturhrifagögn (OECD 2006) og hægt er að sjá flæðirit til hjálpar við ákvörðun á framlengdu einnar kynslóðar æxlunarprófuninni á japönskum rískarpa (MEOGRT) á mynd 2.

Gengið er út frá því að gagnamengin sýni yfirleitt einhalla svaranir. Að auki skal íhuga hvort nota skuli einhliða tölfræðipróf eða tvíhliða tölfræðipróf. Lagt er til að einhliða próf séu notuð nema það séu líffræðileg rök sem gera einhliða próf óhentug. Í eftirfarandi hluta er mælt með tilteknum tölfræðiprófum en ef tölfræðilegar aðferðir, sem eiga betur við og/eða eru með meiri styrk, eru þróaðar til notkunar á þau sértæku gögn sem verða til í framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) skal nota þau tölfræðipróf til að nýta þessa kosti.

Greina skal gögn úr framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT) aðskilið fyrir hvort arfgerðarlegt kyn. Það eru tvær aðferðir til að greina gögn um kynskipta fiska (annaðhvort XX-hængar eða XY-hrygnur). 1) Öll gögn um kynskipta fiska í allri prófuninni eru felld brott nema um algengi kynskiptingar í hverri samhliða prófun. 2) Gögn um alla kynskipta fiska eru skilin eftir í gagnamenginu og greining gerð á grundvelli arfgerðar.

Vefjameinafræðileg gögn

Gert er grein fyrir vefjameinafræðilegum gögnum sem alvarleikastigafjölda sem er metinn með því að nota nýlega þróaða tölfræðiaðferð, RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green o.fl., 2014). Í Rao-Scott-aðlöguninni eru upplýsingum um samhliða prófanir haldið eftir; í verkferlinu „í sneiðum“ eru felldar inn þær líffræðilegu væntingar að alvarleikastigafjöldi hafi tilhneigingu til að aukast með auknum meðferðarstyrkleikum. Að því er varðar hverja greiningu er tilgreint í niðurstöðum RSCABS-prófs í hvaða meðferðum er hærra algengi meinafræðilegra tilvika en í samanburðarhópum og tengt alvarleikastig.

Gögn um frjósemismátt

Greiningar á gögnum um frjósemismátt samanstanda af Jonckheere-Terpstra með stiglækkun eða Williams-prófi til að ákvarða áhrif meðferðar, að því tilskildu að gögnin séu í samræmi við einhalla styrkháða svörun. Með prófi með stiglækkun er allur samanburður gerður með marktækni sem nemur 0,05 og engin aðlögun er gerð á fjölda samanburða. Búist er við að gögnin séu í samræmi við einhalla styrkháða svörun en þetta er hægt að sannreyna, annaðhvort með sjónrænni skoðun á gögnunum eða með því að gera línulegt og annars stigs samanburðarfall á meðaltali meðferðar eftir staðlaða röðunarvörpun á gögnunum. Gerð er leitniprófun nema annars stigs samanburðarfallið sé marktækt og línulega samanburðarfallið ómarktækt. Að öðrum kosti er Dunnett-próf notað til að ákvarða áhrif meðferðar ef gögnin eru normaldreifð með einsleitri dreifni. Ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar er notað Dunn-próf með Bonferonni-Holm-aðlögun. Öll tilgreind próf eru gerð óháð öllum F-eða Kruskal-Wallis-prófum. Frekari upplýsingar eru veittar í OECD 2006.

Hægt er að nota staðgönguaðferðir, s.s. almenn línuleg líkön með Poisson-skekkjum, fyrir hrognatalninguna (án vörpunar) ef tölfræðileg rök eru færð fyrir því (Cameron og Trividi, 2013). Mælt er með tölfræðilegri ráðgjöf ef staðgöngukostur er valinn.

Dagleg hrognatalning í einni kynslóð

Í dreifnigreiningarlíkaninu (ANOVA) er Y=tími*tími+meðferð+ *meðferð+ tími*meðferð+ *tími*meðferð, með handahófskenndum áhrifum á samhliða prófun (kynslóð*meðferð), og tími*samhliða prófun (meðferð), sem gerir kleift að vera með ójafna dreifniþætti af báðum tegundum milli kynslóða. Hér á *tími* við um tíðni hrognatalninga (t.d. dagur eða vika). Þetta er greining með endurteknum mælingum þar sem fylgni milli athugana á sömu samhliða prófununum skýrir eðli gagnanna með endurteknum mælingum.

Aðaláhrif *meðferðar* eru prófuð með því að nota Dunnett- (eða Dunnett-Hsu-) próf sem er aðlagað vegna fjölda samanburða. Þörf er á aðlögun vegna aðaláhrifa frá *kynslóð* eða *tíma* vegna þess að það eru engin „samanburðar“gildi fyrir þessa tvo þætti og hvert par af gildum er samanburður sem getur skipt máli. Að því er varðar þessi tvö aðaláhrif er hægt, ef F-próf fyrir aðaláhrif er marktækt við gildið 0,05, að prófa parasamanburð á þessum þætti þvert á gildin við 0,05 án frekari aðlögunar.

Líkanið inniheldur tveggja og þriggja þátta víxlverkun þannig að aðaláhrif fyrir t.d. *tíma* eru e.t.v. ekki marktæk jafnvel þó að *tími* hafi marktæk áhrif á niðurstöðurnar. Ef tveggja eða þriggja þátta víxlverkun sem felur í sér *tíma* er marktæk við gildið 0,05 er því hægt að samþykkja samanburð á gildum fyrir *tíma* við marktæknina 0,05 án frekari aðlögunar.

Næst koma F-próf fyrir marktækni *meðferðar* innan *tíma*, svokallaðar „sneiðar“ í dreifnigreiningartöflunni. Ef t.d. „sneið“ fyrir *meðferð* í F1-kynslóðinni og *tíma* 12 er marktæk við gildið 0,05 er hægt að samþykkja parasamanburð fyrir *meðferð* í F1-kynslóðinni og *tíma* 12 við gildið 0,05 án frekari aðlögunar. Svipaðar fullyrðingar gilda um próf varðandi *tíma* í F1-kynslóðinni og *meðferð* og fyrir *kynslóð* innan *tíma* og *meðferðar*.

Að lokum, að því er varðar samanburði sem falla ekki undir neinn af framantöldum flokkum, skal aðlaga samanburðina með því að nota Bonferroni-Holm-aðlögun á p-gildin. Frekari upplýsingar um greiningar á slíkum líkönum er að finna í Hocking (1985) og Hochberg og Tamhane (1987).

Að öðrum kosti eru óunnin gögn skráð og lögð fram í rannsóknarskýrslunni sem frjósemismáttur (fjöldi hrogna) í hverri samhliða prófun/dag. Reikna skal út meðaltal óunninna gagna í samhliða prófun og beita síðan kvaðratrótarvörpun. Reikna skal út einhliða dreifnigreiningu á vörpuðu meðaltali úr samhliða prófunum og síðan Dunnett-samanburðarfall. Einnig getur komið að gagni að skoða sjónrænt gögn um frjósemismátt fyrir hverja meðferð og/eða samhliða prófun með punktariti sem sýnir gögnin yfir tímabilið. Með þessu er hægt að gera óformlegt mat á mögulegum áhrifum yfir tímabilið.

Öll önnur líffræðileg gögn

Tölfræðilegar greiningar eru byggðar á þeirri undirliggjandi forsendu að með viðeigandi vali á skammti verði gögnin einhalla. Þannig er gengið út frá því að gögn séu einhalla og þau eru formlega metin m.t.t. einhalla með því að nota línulegt samanburðarfall og annars stigs samanburðarfall. Ef gögnin eru einhalla er mælt með Jonckheere-Terpstra leitniprófi á miðgildi samhliða prófunar (eins og ráðlagt er í OECD 2006). Ef annars stigs samanburðarfallið er marktækt en línulega samanburðarfallið ómarktækt teljast gögnin ekki vera einhalla.

Ef gögnin eru ekki einhalla, einkum vegna minni svörunar einna eða tveggja meðferða með hæsta styrkinn, skal taka til athugunar að fella gagnamengið brott þannig að greiningin sé framkvæmd án þessara meðferða. Þessa ákvörðun verður að taka samkvæmt sérfræðiáliti og öllum tiltækum gögnum, einkum gögnum sem benda til augljósra eiturhrifa á þessum meðferðarstigum.

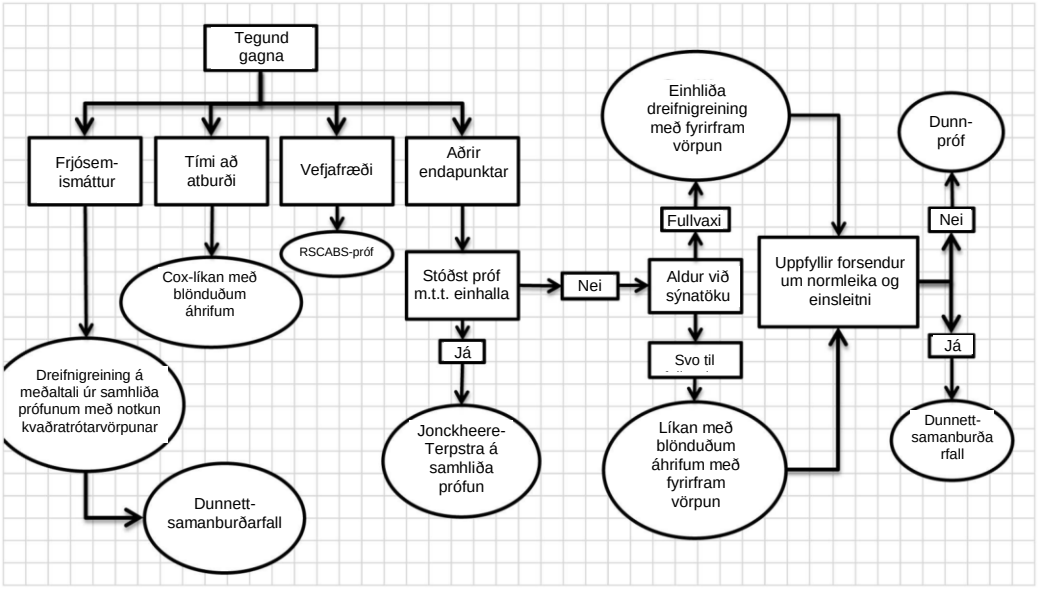
Að því er varðar þyngd og lengd er ekki mælt með vörpun þó að slíkt kunni e.t.v. stundum að vera nauðsynlegt. Þó ert mælt með lograðri vörpun fyrir vítellógeníngögnin; mælt er með kvaðratrótarvörpun fyrir gögn um annars stigs kyneinkenni (SSC) (raufaruggatotur); mælt er með arcsine-kvaðratrótarvörpun fyrir gögn um hlutfall klaks, hundraðshlutfall lifunar, kynjahlutfall og hundraðshlutfall frjórra hrogna. Tími fram að klaki og tími fram að fyrstu hrygningu skal meðhöndlaður sem „tími að atburði“ (e. *time to event data*) þar sem einstakir fósturvísar, sem klekjast ekki á skilgreindu tímabili, eða samhliða prófanir, þar sem engin hrygning verður, eru meðhöndluð sem hægristýfð gögn. Tími fram að klaki skal reiknaður út frá miðgildisdegi klaks í hverri samhliða prófun. Þessa endapunkta skal greina með því að nota líkan Cox fyrir hlutfallslega áhættu með blönduðum áhrifum (e. *mixed-effects Cox proportional hazard model*).

Í líffræðilegum gögnum um sýni úr fullvöxnum fiskum er ein mæling úr hverri samhliða prófun, þ.e. það er einn XX-fiskur og einn XY-fiskur í hverju keri samhliða prófunar. Þess vegna er mælt með því að gera einhliða dreifnigreiningu á meðaltali úr samhliða prófunum. Ef forsendur dreifnigreiningarinnar (normleiki og einsleitni dreifni eins og þau eru metin á leifum dreifnigreiningarinnar með Shapiro-Wilks-prófi og Levene-prófi, eftir því sem við á) eru uppfylltar skal nota Dunnett-samanburðarfall til að ákvarða þær meðferðir sem voru frábrugðnar samanburðinum. Á hinn bóginn skal, ef forsendur dreifnigreiningarinnar eru ekki uppfylltar, gera Dunn-próf til að ákvarða hvaða meðferðir voru frábrugðnar samanburðinum. Mælt er með svipuðu verklagi fyrir gögn sem eru gefin upp sem hundraðshluti (frjósemi, klak og lifun).

Líffræðileg gögn um sýni úr svo til fullvöxnum fiskum eru með 1 til 8 mælingar á hverja samhliða prófun, þ.e. það getur verið breytilegur fjöldi einstaklinga sem leggja sitt af mörkum í meðaltal úr samhliða prófun fyrir hvert arfgerðarlegt kyn. Þess vegna er mælt með því að nota dreifnigreiningarlíkan með blönduðum áhrifum og því næst Dunnett-samanburðarfall ef forsendur um normleika og einsleitni dreifni voru uppfylltar (á leifum dreifnigreiningar með blönduðum áhrifum). Ef þær voru ekki uppfylltar skal gera Dunn-próf til að ákvarða hvaða meðferðir voru frábrugðnar samanburðinum.

Mynd 2

Flæðirit yfir þær tölfræðiaðferðir sem mælt er með fyrir greiningu gagna úr framlengdri einnar kynslóðar æxlunarprófun á japönskum rískarpa (MEOGRT)



HEIMILDIR

1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 **GREINING Á VEXTI OG ÞROSKA FROSKDÝRALIRFA (LAGDA)**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 241 um prófanir (2015). Þörfin til að þróa og fullgilda greiningu sem getur fundið skaðlegar afleiðingar váhrifa frá eitruðum íðefnum á froskdýr og lýst þeim sprettur af áhyggjum af því að magn íðefna í umhverfinu geti valdið skaðlegum áhrifum, bæði á menn og villtar lífverur. Í viðmiðunarreglu OECD um prófanir „Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)“ (greining á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)) er lýst eiturhrifaprófun á froskdýrategundum þar sem vöxtur og þroski er athugaður frá frjóvgun og gegnum snemmstig ungviðistímabilsins. Þetta er greining (yfirleitt 16 vikna) þar sem þroskun á fyrstu stigum, myndbreyting, lifun, vöxtur og æxlunarþroski, að hluta til, eru metin. Hún gerir það einnig kleift að mæla samstæðu annarra endapunkta sem gefa færi á að gera greiningarmat á innkirtlatruflandi íðefnum sem grunur er um eða öðrum tegundum efna sem hafa eiturhrif á þroskun og æxlun. Aðferðin sem lýst er í þessari prófunaraðferð er leidd út af vinnu Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (U.S. EPA) við fullgildingu með afrískum klófroskum (*Xenopus laevis*) með stuðningsvinnu frá Japan (1. heimild). Þó að unnt sé að laga aðrar froskdýrategundir að aðferðarlýsingu prófunar fyrir vöxt og þroskun, þar sem getan til að ákvarða erfðafræðilegt kyn er mikilvægur þáttur, eiga sértækar aðferðir og athugunarendapunktar, sem eru útlistuð í þessari prófunaraðferð, einungis við um *Xenopus laevis*.

2. Greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er prófun á froskdýrum á hærra aðferðarþrepi til að safna heildstæðari upplýsingum um tengsl milli styrks og svörunar varðandi neikvæð áhrif sem henta til notkunar við hættugreiningu og lýsingu á eiginleikum og við vistfræðilegt áhættumat. Greiningin passar á 4. stig „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakarammi Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum) þar sem prófanir í lífi veita einnig upplýsingar um skaðleg áhrif í tengslum við endapunkta sem skipta máli vegna innkirtla (2. heimild). Almenna tilraunahönnunin felur í sér að fósturvísar af tegundinni *X. laevis* á 8.–10. NF-stigi (Nieuwkoop og Faber) (3. heimild) eru látnir verða fyrir váhrifum frá a.m.k. fjórum mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis (alla jafna er styrkmunur ekki minni en sem svarar hálfu log-vörpuðu bili) og samanburði, þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarsýninu, með einu undirsýni teknu meðan á greiningunni stendur á 62. NF-stigi (≤ 45 eftir frjóvgun; alla jafna u.þ.b. 45 dagar (def)). Það eru fjórar samhliða prófanir af hverjum prófunarstyrkleika og átta samhliða prófanir í samanburðarhópnum. Endapunktar sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir (með undirsýninu teknu meðan á greiningunni stendur og lokasýninu þegar prófun lýkur) eru m.a. þeir sem gefa vísbendingu um almenn eiturhrif: dánartala, óeðlilegt atferli og ákvarðanir á vexti (lengd og þyngd) sem og endapunktar sem eru til þess ætlaðir að lýsa sértækum verkunarháttum eiturhrifa á innkirtla sem beinast að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum lífeðlisfræðilegum ferlum. Í aðferðinni er aðaláherslan lögð á möguleg stofntengd áhrif (þ.e.a.s. neikvæð áhrif á lifun, þroskun, vöxt og þroskun æxlunarfæra) til að reikna út styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) eða hrifstyrk sem veldur x % breytingu (ECx) á endapunktinum sem er mældur. Þó skal bent á að ECx-nálganir henta sjaldan fyrir stórar rannsóknir af þessu tagi þar sem það getur verið óhagkvæmt að fjölga prófunarstyrkleikum til að unnt sé að ákvarða tilætlað ECx. Einnig skal bent á að aðferðin nær ekki yfir æxlunarfasann sjálfan. Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

3. Vegna takmarkaðs fjölda prófaðra íðefna og rannsóknarstofa sem taka þátt í fullgildingu á þessari frekar flóknu greiningu, einkum hefur samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa ekki verið skjalfest með tilraunagögnum fram að þessu, er fyrirsjáanlegt að þegar fullnægjandi fjöldi rannsókna liggur fyrir til að ganga úr skugga um áhrif þessarar nýju rannsóknarhönnunar verði OECD-viðmiðunarregla um prófanir nr. 241 rýnd og, ef nauðsyn krefur, endurskoðuð í ljósi þeirrar reynslu sem fengist hefur. Greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er mikilvæg greining til að fjalla um mögulega þætti sem stuðla að hnignun froskdýrastofna með því að meta áhrif váhrifa frá íðefnum meðan viðkvæmt lirfustig stendur yfir þar sem áhrif á lifun og þroskun, þ.m.t. eðlileg þroskun æxlunarfæra, kunna að hafa neikvæð áhrif á stofna.

4. Prófunin er hönnuð til að greina afgerandi endapunkt(a) sem stafa(r) bæði af gangvirkjum innkirtlastarfsemi og starfsemi sem er ekki innkirtlastarfsemi og tekur til greiningarendapunkta sem eru að hluta til sértækir fyrir mikilvæg innkirtlakerfi. Það skal bent á að þar til greiningin á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) var þróuð var ekki til nein fullgilt greining fyrir froskdýr sem þjónaði þessum tilgangi.

5. Áður en greiningin hefst er mikilvægt að hafa upplýsingar um eðlisefnafræðilega eiginleika prófunaríðefnisins, einkum til að unnt sé að framleiða stöðugar íðefnalausnir. Einnig er nauðsynlegt að vera með greiningaraðferð með nægilegu næmi til að sannreyna styrkleika prófunaríðefnis. Á u.þ.b. 16 vikna tímabili útheimtir greiningin samtals 480 dýr, þ.e. fósturvísa af tegundinni *X. laevis* (eða 640 fósturvísa ef samanburður með leysi er notaður) til að tryggja að styrkur prófunarinnar sé nægur til að meta endapunkta sem skipta máli fyrir þýðið, s.s. vöxt, þroskun og æxlunarþroska.

6. 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. Enn fremur er frjósemi ekki metin beint með þessari greiningu svo e.t.v. á hún ekki við til notkunar á hærra stigi en því 4. í „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (hugtakaramma Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum).

VÍSINDALEGUR GRUNDVÖLLUR FYRIR PRÓFUNARAÐFERÐINNI

7. Stór hluti af núverandi þekkingu okkar á líffræði froskdýra er fenginn með því að nota tegundina *X. laevis* sem tilraunadýr á rannsóknarstofum. Þessa tegund er unnt að rækta að staðaldri á rannsóknarstofunni, hægt er að framkalla egglos með því að nota æðabelgskynhormónavaka manna (hCG) og greiður aðgangur er að birgðum af dýrum hjá atvinnuræktendum.

8. Líkt og hjá öllum hryggdýrum er æxlun froskdýra stjórnað af undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli. (4. heimild). Estrógen og andrógen eru milliliðir í þessu innkirtlakerfi sem stjórna þroskun og lífeðlisfræði í vefjum kynbundinnar tvíbreytni. Þessi öxull er sérlega virkur í þremur aðgreindum fösum í lífsferli froskdýra: 1) sérhæfingu kynkirtla meðan þroskun lirfanna stendur yfir, 2) þroskun annars stigs kyneinkenna og kynkirtlaþroskun meðan ungviðisfasinn stendur yfir og 3) virkri æxlun hjá fullorðnum dýrum. Sérhver þessara þriggja þroskunarkosta er að öllum líkindum næmur fyrir innkirtlatruflun af völdum tiltekinna efna, s.s. estrógens og andrógens, sem leiðir að lokum til þess að lífverurnar tapa æxlunarhæfni.

9. Þroskun kynkirtla hefst á 43. NF-stigi þegar þroskunarlega tvíræð (e. *bipotential*) kynkirtlafelling þroskast fyrst. Sérhæfing kynkirtlanna hefst á 52. NF-stigi þegar frumkímfrumur berast annaðhvort yfir í mergvefinn (karldýr) eða halda sig á barkarsvæði (kvendýr) kynkirtlanna sem eru að þroskast (3. heimild). Á sjötta áratugnum var fyrst greint frá því að þetta ferli kynjaaðgreiningar kynkirtlanna í Xenopus væri næmt fyrir efnafræðilegum breytingum. (5. og 6. heimild). Váhrif af völdum estradíóls á halakörtur á þessu tímabili kynkirtlasérhæfingar leiðir til þess að karldýr skipta um kyn og þegar þau ná fullorðinsaldri verða þau fullvirk kvendýr (7.–8. heimild). Virk kynskipti kvendýra yfir í karldýr eru einnig möguleg og greint hefur verið frá slíku í kjölfar ígræðslu á eistnavef í halakörtur (9. heimild). Jafnvel þótt váhrif frá arómatasa-hemli valdi einnig virkum kynskiptum hjá *X. tropicalis* (10. heimild) hefur ekki verið sýnt fram á þetta hjá *X. laevis*. Rannsóknarsögulega séð hafa áhrif eiturefna á sérhæfingu kynkirtla verið metin með vefjafræðilegri rannsókn á kynkirtlunum við myndbreytingu og einungis var hægt að ákvarða kynskipti með greiningu á kynjahlutföllum. Þangað til

nýlega voru ekki til leiðir til að ákvarða beint erfðafræðilegt kyn *Xenopus*. Nýleg staðfesting á kynbundnum merkjum í *X. laevis* gerir það þó kleift að ákvarða erfðafræðilegt kyn og unnt að bera kennsl á kynskipt dýr.

10. Hjá karldýrum er þroski ungviðis í takt við hærri gildi testósteróns í blóðinu sem samsvarar þróuninni á annars stigs kyneinkennum sem og þroskun eistna. Hjá kvendýrum framleiða eggjastokkarnir estradíól sem leiðir til þess að vítellógenín kemur fram í blóðvökvanum, eggfrumur með gulumyndun í eggjastokknum og eggjaleiðarar þroskast. Eggjaleiðarar eru annars stigs kyneinkenni kvendýra sem eru virk í eggfrumuþroska meðan æxlun stendur yfir. Hlaupkenndur hjúpur myndast utan um eggfrumurnar þegar þær fara gegnum eggjaleiðarann og safnast saman í eggjapokanum (e. *ovisac*), tilbúin til frjóvgunar. Þroskun eggjaleiðara virðist stýrt af estrógeni því það er fylgni milli þroskunar og estradíólgilda í blóði *X. laevis* (13. heimild) og *X. tropicalis* (12. heimild). Greint hefur verið frá þroskun eggjaleiðara í karldýrum eftir váhrif frá fjölklóruðum bífenýlsamböndum (14. heimild) og 4-tert-oktýlfenóli (15. heimild).

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Tilhögun prófunarinnar felur í sér að fósturvísar af tegundinni *X. laevis* á 8.–10. NF-stigi eru látnir verða fyrir váhrifum í vatni frá fjórum mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis, sem og samanburði, þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarsýninu, með einu undirsýni teknu meðan á greiningunni stendur á 62. NF-stigi. Þó að það sé e.t.v. einnig mögulegt að gefa mjög vatnsfælin íðefni með fóðri hefur lítil reynsla fengist fram að þessu af því að nota þessa váhrifaleið í þessari greiningu. Það eru fjórar samhliða prófanir af hverjum prófunarstyrkleika og átta samhliða prófanir fyrir hvern samanburðarhóp sem er notaður. Endapunktar sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir eru m.a. þeir sem gefa vísbendingu um almenn eiturhrif (þ.e. dánartala, óeðlilegt atferli og ákvörðun á vexti (lengd og þyngd)) sem og endapunktar sem eru til þess ætlaðir að lýsa sértækum verkunarháttum eiturhrifa á innkirtla sem beinast að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum lífeðlisfræðilegum ferlum (þ.e. vefjameinafræðileg rannsókn skjaldkirtilsins, vefjameinafræðileg rannsókn kynkirtla og kynkirtlarásar (e. *gonad duct*), óeðlileg þroskun, vítellógenín í blóðvökva (valkvætt) og arfgerðarleg/svipfarsleg kynjahlutföll).

GILDISVIÐMIÐANIR PRÓFUNAR

12. Eftirfarandi viðmiðanir eiga við fyrir gildisviðmiðanir prófunar:

— styrkur uppleysts súrefnis skal vera ≥ 40% af mettunargildi lofts í allri prófuninni,

— vatnshitastig skal vera á bilinu 21 ± 1 °C og munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 1,0 °C,

— pH-gildi prófunarlausnar skal haldið á bilinu 6,5 til 8,5 og munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 0,5,

— gögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðefnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligilda,

— dánarhlutfall á váhrifatímabilinu skal vera ≤ 20% í hverri samhliða prófun í samanburðarhópunum,

— ≥ 70% lífvænleiki í gotinu sem er valið til að hefja rannsóknina,

— miðgildistíminn til 62. NF-stigs í samanburðarhópunum skal vera ≤ 45 dagar,

— meðalþyngd prófunarlífvera á 62. NF-stigi og við lok greiningarinnar, í samanburðarhópum og samanburði með leysi (ef hann er notaður), skal ná 1,0 ± 0.2 annars vegar og 11,5 ± 3 g hins vegar.

13. Mælt er með því að a.m.k. þrjú meðferðarstig með þremur samhliða prófunum, sem ekki eru ótryggar, séu tiltæk til greiningar en þetta er ekki gildisviðmiðun. Afbrigðilegar dánartölur sem gerir meðferðarprófun ótrygga eru skilgreint sem > 4 dauðsföll (> 20%) í tveimur eða fleiri samhliða prófunum sem ekki er unnt að skýra með tæknilegri villu. Að minnsta kosti þrjú meðferðarstig án augljósra eiturhrifa skulu vera tiltæk til greiningar. Augljós merki eiturhrifa geta falið í sér, en takmarkast ekki við, að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið og sýna engin viðbrögð við áreiti, formfræðilegan afbrigðileika (t.d. vanskapaðir útlimir), blæðandi vefjaskemmdir og bjúg á kvið.

14. Ef frávik frá gildisviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunarniðurstaðnanna og þessi frávik og atriði skulu koma fram í prófunarskýrslunni.

LÝSING Á AÐFERÐUM

Búnaður

15. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:

a) hitastýringartæki (t.d. hitarar eða kælar stillanlegir að 21 ± 1 °C),

b) hitamælir,

c) tvísæissmásjá til krufningar og krufningaráhöld,

d) stafræn myndavél með a.m.k. 4 megapixla upplausn og míkróstillingu (ef þörf krefur),

e) fínvog sem getur mælt niður í 0,001 mg eða 1 µg,

f) mælir fyrir uppleyst súrefni og sýrustigsmælir,

g) ljósstyrksmælir sem getur mælt í lúx-einingum.

Vatn

Uppruni og gæði

16. Hægt er að nota allt þynningarvatn sem er tiltækt á staðnum (t.d. lindarvatn eða viðarkolasíað kranavatn) og gerir halakörtum af tegundinni *X. laevis* kleift að vaxa og þroskast eðlilega og sannanir fyrir eðlilegum vexti í þessu vatni skulu að vera tiltækar. Sökum þess að gæði staðarvatns geta verið mjög breytileg milli svæða skal takast á hendur greiningu á vatnsgæðum, einkum ef rannsóknarsöguleg gögn um notkun vatnsins til að ala froskdýralirfur eru ekki tiltæk. Mælingar á *þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca2+, Mg2+, Na+, K+, Cl-,SO42-),* varnarefnum, heildarmagni lífræns kolefnis og svifagna skulu gerðar áður en prófun hefst og/eða t.d. á sex mánaða fresti ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 2. viðbæti.

Joðíðstyrkur í prófunarvatni

17. Til þess að skjaldkirtillinn myndi skjaldkirtilshormóna til að styðja eðlilega myndbreytingu þarf nægilegt magn af joðíði að vera tiltækt fyrir lirfurnar með samblandi af vatns- og fóðurgjöfum. Sem stendur eru ekki til viðmiðunarreglur, fengnar á grundvelli reynslu, um lágmarksstyrk joðíðs í fóðri eða vatni til að tryggja viðeigandi þroskun. Tiltækileiki joðíðs getur þó haft áhrif á svörunargetu skjaldkirtilskerfisins gagnvart skjaldkirtilsvirkum efnum og þekkt er að það stillir grunnstarfsemi skjaldkirtilsins sem verðskuldar athygli þegar niðurstöðurnar úr vefjameinafræðilegri rannsókn á skjaldkirtlinum eru túlkaðar. Sýnt hefur verið fram á, á grundvelli fyrra starfs, að greiningin reynist vel þegar styrkur joðíðs (I-) í þynningarvatninu er á bilinu 0,5–10 µg/l. Helst ætti lágmarksstyrkleiki joðíðs í þynningarvatninu að vera 0,5 µg/l í allri prófuninni (bætt við sem natríum- eða kalíumsalt). Ef prófunarvatnið er endurgert úr afjónuðu vatni skal bæta *við joði í styrk að lágmarki 0,5 µg/l. Greina skal frá mældum styrk joðíðs í prófunarvatninu (þ.e. þynningarvatni) og ef* joði eða öðrum söltum (ef þau eru notuð) er bætt í prófunarvatnið. Einnig má mæla joðinnihald í fóðrinu, til viðbótar við prófunarvatnið.

Váhrifakerfi

18. Prófunin var þróuð með notkun þynningarkerfis með gegnumstreymi. Þeir íhlutir kerfisins sem komast í snertingu við vatn skulu vera úr gleri, ryðfríu stáli og/eða öðrum efnafræðilega óvirkum efnum. Váhrifatankar skulu vera ker úr gleri eða ryðfríu stáli og rúmmál tanksins skal vera á bilinu u.þ.b. 4,0–10,0 l (vatnsdýpt að lágmarki 10–15 cm). Kerfið skal vera fært um að bera alla váhrifastyrkleika, samanburð og samanburð með leysi, ef nauðsyn krefur, með fjórar samhliða prófanir á hverja meðferð og átta í samanburðarhópnum. Streymi í hvern tank skal vera stöðugt, bæði að því er varðar að viðhalda líffræðilegu ástandi og íðefnaváhrifum. Mælt er með því að streymið sé viðeigandi (t.d. að minnsta kosti 5 *vatnsskipti í tanknum á dag) til að komast hjá því að styrkur íðefna minnki vegna efnaskipta af völdum bæði* prófunarlífvera og lagarörvera sem eru til staðar í kerinu eða niðurbrots sem á sér stað án tilstillis lífvera (vatnsrof, ljósrof) eða eyðingar (uppgufun, sog). Raða skal meðferðartönkunum af handahófi í váhrifakerfið til að draga úr hugsanlegum áhrifum af völdum staðsetningar, þ.m.t. lítils háttar frávikum í hitastigi, ljósstyrk o.s.frv. Frekari upplýsingar um uppsetningu á váhrifakerfum með gegnumstreymi er unnt að fá í „ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians“ (16. heimild).

Íðefnagjöf: undirbúningur prófunarlausnanna

19. Til þess að gera prófunarlausnir í váhrifakerfinu skal skammta stofnlausn prófunaríðefnisins í váhrifakerfið með viðeigandi dælu eða öðrum búnaði. Kvarða skal streymi stofnlausnarinnar í samræmi við greiningarlega staðfestingu á prófunarlausnunum áður en váhrif hefjast og mæla rúmmál hennar reglulega meðan prófunin stendur yfir. Prófunarlausnin í hverju keri skal endurnýjuð með að lágmarki 5 rúmmálsendurnýjunum/dag.

20. Aðferðin sem notuð er til að setja íðefnið í kerfið getur verið breytileg, háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum þess. Af þeim sökum skal útvega grunnupplýsingar um íðefnið, áður en prófun hefst, sem skipta máli við að ákvarða prófunarhæfni þess. Gagnlegar upplýsingar um prófunaríðefnasértæka eiginleika eru m.a. byggingarformúla, sameindaþyngd, hreinleiki, stöðugleiki í vatni og birtu, pKa og Kow, vatnsleysni (helst í prófunarmiðlinum) 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. Ef upplýsingarnar sem eru tilgreindar hér að framan liggja ekki fyrir skal gaumgæfa vandlega hvort framkvæma eigi prófunina sökum þess að hönnun rannsóknarinnar er háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og án þessara gagna getur verið erfitt eða þýðingarlaust að túlka prófunarniðurstöðurnar. Fyrir skal liggja áreiðanleg greiningaraðferð til að mæla magn prófunaríðefnisins í prófunarlausnunum með þekktri og skráðri nákvæmni og greiningarmörkum. Hægt er að leysa vatnsleysanleg prófunaríðefni upp í deiliskömmtum af þynningarvatni í styrk sem gefur markprófunarstyrkinn í gegnumstreymiskerfi. Að því er varðar íðefni sem eru fljótandi eða föst efni við stofuhita og í meðallagi uppleysanleg í vatni getur þurft að nota mettara fyrir vökva:vökva eða vökva:fast efni (t.d. súlur með glerull) (19. heimild). Þó að það sé e.t.v. einnig mögulegt að gefa mjög vatnsfælin prófunaríðefni með fóðri hefur lítil reynsla fengist af því að nota þessa váhrifaleið í þessari greiningu.

21. 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- og/eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur/-kerfi eða hlutlaus skömmtunarkerfi (20. heimild) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Ákjósanlegast er að nota prófunarkerfi án meðleysis; þó búa mismunandi prófunaríðefni yfir breytilegum eðlisefnafræðilegum eiginleikum sem munu líklega krefjast mismunandi aðferða við tilreiðslu á vatni fyrir íðefnaváhrif. Reyna skal eftir megni að forðast leysa eða burðarefni sökum þess að: 1) tilteknir leysar geta sjálfir leitt til eiturhrifa og/eða óæskilegra eða óvæntra viðbragða, 2) prófanir á íðefnum ofan við vatnsleysni þeirra (eins og getur oft gerst með notkun leysa) geta leitt til ónákvæmra ákvarðana á hrifstyrk, 3) notkun á leysum í lengri prófunum getur leitt til verulegrar „örveruþekju“ tengdri örveruvirkni og getur haft áhrif á umhverfisaðstæður sem og getu til að viðhalda váhrifastyrkleikum og 4) ef rannsóknarsöguleg gögn sem sýna fram á að leysirinn hafi ekki áhrif á niðurstöður rannsóknarinnar eru ekki fyrir hendi útheimtir notkun leysa samanburðarmeðferð með leysi sem hefur veruleg áhrif á velferð dýra þar eð þörf er á viðbótardýrum til að framkvæma prófunina. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á er hægt að nota leysi sem síðasta úrræði og 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) (21. heimild) til að ákvarða bestu aðferðina. Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnisins og tiltækileika rannsóknarsögulegra samanburðargagna um leysinn. Ef rannsóknarsöguleg gögn eru ekki til skal ákvarða hentugleika leysis áður en endanlega rannsóknin er framkvæmd. Ef til þess kemur að ekki er hægt að komast hjá því að nota leysi og örveruvirkni (örveruþekja) verður til er mælt með því að skrá/gefa skýrslu um örveruþekjuna í hverjum tanki (a.m.k. vikulega) í allri prófuninni. Helst ætti að halda styrk leysisins stöðugum í samanburðinum með leysi og öllum prófunarmeðferðunum. Ef styrk leysis er ekki haldið stöðugum skal nota hæsta styrk leysisins í prófunarmeðferðinni í samanburðinum með leysi. Í tilvikum þar sem leysir er notaður sem burðarefni skal hámarksstyrkur leysis ekki fara yfir 100 µl/l eða 100 mg/l (21. heimild) og mælt er með því að halda styrk leysisins eins lágum og unnt er (t.d. ≤20 µl/l) til að komast hjá hugsanlegum áhrifum leysisins á mælda endapunkta (22. heimild).

Tilraunadýr

Prófunartegund

22. Prófunartegundin er *X. laevis* vegna þess að hún er: 1) almennt ræktuð á rannsóknarstofum á heimsvísu, 2) hún er auðfáanleg frá sölubirgjum og 3) unnt er að ákvarða erfðafræðilegt kyn hennar.

Umönnun og undaneldi fullvaxinna dýra

23. Viðeigandi umönnun og undaneldi *X. laevis* er lýst í stöðluðum leiðbeiningum (23. heimild). Read (24. heimild) lýsir einnig hýsingu og umönnun *X. laevis*. Til að framkalla æxlun er æðabelgskynhormónavaka manna sprautað í kviðarhol þriggja til fimm para af fullvöxnum kven- og karldýrum. Tilraunakvendýr og -karldýr eru sprautuð, annars vegar með u.þ.b. 800–1000 IU og hins vegar með 500–800 IU, með æðabelgskynhormónavaka manna sem er uppleystur í 0,6–0,9% saltlausn (eða Ringer-lausn fyrir froska, jafnþrýstin saltlausn til notkunar fyrir froskdýr). Innsprautunarmagn skal vera

u.þ.b. 10 µl/g líkamsþyngdar (~1 000 µl). Eftir það eru undaneldispör höfð í stórum tönkum, ótrufluð og í kyrrstöðu, til að hvetja til mökunarfaðmlags. Í hverjum undaneldistanki skal vera falskur botn úr ryðfríum stálmöskvum (t.d. 1,25 cm op) þannig að eggin geti fallið til botns í tanknum. Froskar sem eru sprautaðir með æðabelgskynhormónavaka manna síðla dags losa yfirleitt flest sín egg fyrir miðjan morgun næsta dag. Eftir að nægilegt magn af eggjum hefur verið losað og þau frjóvguð skal fjarlægja fullvaxin dýr úr undaneldistönkunum. Síðan er eggjunum safnað saman og hlaupkenndi hjúpurinn fjarlægður með L-systeínmeðferð (23. heimild). Tilreiða skal 2% L-systeínlausn og stilla pH-gildið að 8.1 með 1 M af NaOH. Þessari 21 °C lausn er síðan bætt í 500 ml keiluflösku sem inniheldur egg úr einu goti og hringsnúið varlega í eina til tvær mínútur og síðan skoluð vandlega 6–8 sinnum með 21 °C ræktunarvatni. Eggin eru síðan flutt í kristöllunarskál og ákvörðuð sem > 70% lífvænleg með hverfandi afbrigðileika hjá fósturvísum sem sýna frumuskiptingu.

TILHÖGUN PRÓFUNAR

Prófunarstyrkleikar

24. Mælt er með því að nota a.m.k. fjóra styrkleika íðefna og viðeigandi samanburð (þ.m.t. samanburður með leysi, ef nauðsyn krefur). Almennt er mælt með að bilin milli styrkleika (bilstuðull) fari ekki yfir 3.2.

25. Að því er varðar þessa prófun skal nota niðurstöður sem til eru úr rannsóknum á froskdýrum, að því marki sem mögulegt er, við að ákvarða hæsta prófunarstyrk til þess að komast hjá styrkleika sem er greinilega eitraður. Upplýsingar úr t.d. megindlegum venslum efnabyggingar og virkni, ályktun út frá byggingarlega hliðstæðum efnum og gögnum úr rannsóknum sem til eru á froskdýrum, s.s. prófunaraðferð C.38: greining á myndbreytingu hjá froskdýrum (25. heimild) og „Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus“ (23. heimild) og/eða prófunum á fiskum, s.s. prófunaraðferðir C.48, C.41 og C.49 (26.–28. heimild), geta stuðlað að því að ákvarða þennan styrkleika. Áður en rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er keyrð má framkvæma tilraun til að ákvarða skammtastærð. Mælt er með því að váhrifin til að ákvarða skammtastærð hefjist innan sólarhrings eftir frjóvgun og þeim haldið áfram í 7–14 daga (eða lengur, ef þörf krefur) og að prófunarstyrkleikarnir séu fastsettir þannig að bilið milli prófunarstyrkleikanna sé ekki stærra en sem nemur tugaþrepamillibili. Niðurstöður úr tilrauninni til að ákvarða skammtastærð ættu að þjóna þeim tilgangi að fastsetja hæsta prófunarstyrk í rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA). Athygli er vakin á því að ef nota þarf leysi er hægt að ákvarða hentugleika leysisins (þ.e. hvort hann kann að hafa áhrif á niðurstöðu rannsóknarinnar) sem hluta af tilrauninni til að ákvarða skammtastærð.

Samhliða prófanir innan meðferðar- og samanburðarhópa

26. Nota skal a.m.k. fjóra tanka samhliða prófana fyrir hvern prófunarstyrk og a.m.k. átta samhliða prófanir fyrir samanburðinn (og samanburð með leysi, ef þörf krefur) (þ.e. fjöldi samhliða prófana í samanburðinum og sérhverjum samanburði með leysi skal vera tvöfalt meiri en fjöldi samhliða prófana í hverjum meðferðarhóp til að tryggja viðeigandi tölfræðilegan styrk). Hver samhliða prófun skal ekki innihalda fleiri en 20 dýr. Lágmarksfjöldi dýra sem er unnið með er 15 (5 fyrir undirsýni á 62. NF-stigi og 10 ungviði). Viðbótardýrum er þó bætt í hverja samhliða prófun til að gera ráð fyrir að þrátt fyrir dánartölu viðhaldist þessi nauðsynlegi 15 dýra fjöldi.

VERKFERLI

Yfirlit greiningar

27. Greiningin er hafin með nýlega gotnum fósturvísum (8.–10. NF-stig) og heldur áfram inn í ungviðisþroska. Skoðað er daglega hvort dýr séu dauð eða sýni merki um afbrigðilegt atferli Á 62. NF-stigi er tekið undirsýni úr lirfunum (allt að 5 dýr í hverri samhliða prófun) og mismunandi endapunktar rannsakaðir (tafla 1). Eftir að öll dýrin hafa náð 66. NF-stiginu, þ.e. þegar myndbreytingu er lokið (eða eftir 70 dögum frá því að greiningin hófst, hvort sem verður fyrr), er handahófskennd förgun (en án undirsýnatöku) til að fækka dýrunum (10 í hverjum tanki) (sjá 43. lið) og eftirlifandi dýr eru látin verða fyrir váhrifum áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðinum. Við lok prófunar (sýnataka úr ungviði) eru gerðar viðbótarmælingar (tafla 1).

Váhrifaskilyrði

28. Fullfrágengna samantekt á prófunarmæliþáttum er að finna í 3. viðbæti. Meðan váhrifatímabilið stendur yfir skal mæla uppleyst súrefni, hitastig og sýrustig prófunarlausnanna daglega. Eðlisleiðni, basavirkni og harka eru mæld einu sinni í mánuði. Að því er varðar vatnshitastig prófunarlausnanna skal munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka (á einum degi) ekki fara yfir 1,0 °C. Að því er varðar pH-gildi prófunarlausnanna skal munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka ekki fara yfir 0,5.

29. Sjúga má daglega úr váhrifatönkunum til að fjarlægja óétið fóður og úrgangsefni en þess skal gætt að forðast víxlmengun í tönkunum. Þess skal gætt að lágmarka streitu og skaða sem dýrin verða fyrir, einkum við tilflutning, þrif á kerinu og meðhöndlun. Forðast skal streituvaldandi aðstæður/athafnir, s.s. hávær og/eða stöðug hljóð, bank í kerið, titring í tankinum.

Tímalengd váhrifa frá prófunaríðefninu

30. Váhrif eru hafin með nýlega gotnum fósturvísum (8.–10. NF-stig) og haldið áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs (≤ 45 dögum frá því að greiningin hefst) í samanburðarhópnum. Almennt stendur rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) yfir í 16 vikur (að hámarki 17 vikur).

Upphaf greiningar

31. Undaneldisdýr sem eru notuð til að hefja greininguna skulu áður hafa sýnt að þau geti eignast afkvæmi sem hægt er að kyngreina erfðafræðilega (5. viðbætir). Eftir að fullorðin dýr hafa gotið er fósturvísum safnað saman, þeir meðhöndlaðir með systeíni til að fjarlægja hlaupkennda hjúpinn og skimaðir fyrir lífvænleika. Systeínmeðhöndlun gerir kleift að meðhöndla fósturvísana meðan skimun fer fram án þess að þeir festist á yfirborðum. Skimun fer fram undir krufningarsmásjá og dropateljari af hentugri stærð er notaður til að fjarlægja ólífvænlega fósturvísa. Ákjósanlegt er að eitt got sem gefur yfir 70% lífvænleika sé notað í prófunina. Fósturvísum á 8.–10. NF-stigi er dreift af handahófi í tanka fyrir váhrifameðferð sem innihalda viðeigandi rúmmál af þynningarvatni þangað til hver tankur inniheldur 20 fósturvísa. Meðhöndla skal fósturvísana varlega við þennan flutning til að lágmarka streitu vegna meðhöndlunar og til að forðast hvers kyns áverka. Eftir 96 klst. frá frjóvgun ættu halakörturnar að hafa flutt sig upp vatnssúluna og vera farnar að festa sig á hliðar tanksins.

Fóðrunarfyrirkomulag

32. Fóður og fóðrunartíðni breytast á mismunandi lífsstigum *X. laevis* og eru mjög mikilvægur þáttur í aðferðarlýsingu rannsóknar á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA). Óhófleg fóðrun á lirfustiginu leiðir yfirleitt til aukinni tíðni og alvarleika hryggskekkju (8. viðbætir) og hana ætti að forðast. Á hinn bóginn leiðir vanfóðrun á lirfustiginu til mjög breytilegs þroskunarhraða í samanburðinum sem getur teflt tölfræðilegum styrk í tvísýnu eða ruglað niðurstöður úr prófun. Í 4. viðbæti er að finna fóður sem mælt er með fyrir lirfur og ungviði og fóðrunarfyrirkomulag fyrir *X. laevis* við gegnumstreymisskilyrði en staðgöngukostir eru heimilaðir að því tilskildu að prófunarlífverurnar vaxi og þroskist á fullnægjandi hátt. Mikilvægt er að taka mið af því að ef innkirtlasértækir endapunktar eru mældir skal fóðrið vera laust við innkirtlavirk efni, s.s. sojamjöl.

Fóðrun lirfa

33. Fóður sem mælt er með fyrir lirfur samanstendur af upphafsfóðri fyrir silung, *Spirulina* þörungaskífum og gullfiskafóðri (t.d.TetraFin®-flögur, Tetra, Þýskaland), blandað saman í ræktar- (eða þynningar-) vatni. Þessi blanda er gefin þrisvar á dag virka daga og einu sinni á dag um helgar. Halakörtur eru einnig fóðraðar á lifandi saltvatnsrækjum, *Artemia* spp., sólarhringsgömlum krabbalirfum, tvisvar á dag virka daga og einu sinni á dag um helgar frá og með 8. degi eftir frjóvgun. Fóðrun lirfanna, sem ætti að vera eins í hverju prófunarkeri, ætti að gera tilraunadýrum kleift að vaxa og þroskast á tilhlýðilegan hátt til þess að tryggja samanburðarnákvæmni greiningarniðurstaðnanna og að hægt sé að yfirfæra þær: 1) miðgildistími til 62. NF-stigs í samanburði skal vera ≤ 45 dagar og 2) mælt er með að meðalþyngd sé innan við 1,0 ± 0.2 g á 62. NF-stigi í samanburði.

Fóðrun ungviðis

34. Þegar myndbreytingu er lokið samanstendur fóðrunarfyrirkomulagið af sökkvandi hágæðafóðri fyrir froska, t.d. „Sinking Frog Food -3/32“ (Xenopus Express, FL, Bandaríkin) (4. viðbætir). Að því er varðar ungfroska (snemma í ungviðisfasanum) eru kögglarnir settir í kaffikvörn eða blandara í stutta stund eða muldir með staut í mortéli til að minnka þá. Þegar ungviðið er orðið nógu stórt til að éta heila köggla er ekki lengur nauðsynlegt að mala þá eða mylja. Gefa skal dýrunum einu sinni á dag. Fóðrun ungviðisins ætti að gera lífverunum kleift að vaxa og þroskast á tilhlýðilegan hátt: mælt er með meðalþyngd innan 11,5 ± 3 g hjá samanburðarungviði við lok greiningarinnar.

Efnagreining

35. Áður en greiningin er hafin skal ákvarða stöðugleika prófunaríðefnisins (t.d. leysni, niðurbrjótanleika og rokgirni) og allar greiningaraðferðir sem þörf er á, t.d. með því að nota fyrirliggjandi upplýsingar eða þekkingu. Þegar skammtað er í þynningarvatnið er mælt með því að prófunarlausnir úr hverjum tanki samhliða prófunar séu settar í greiningu áður en rannsóknin hefst til að sannreyna nothæfi kerfisins. Meðan váhrifatímabilið stendur yfir er styrkur prófunaríðefnisins ákvarðaður með hæfilegu millibili, helst í hverri viku í a.m.k. einni samhliða prófun í hverjum meðferðarhópi, og skipt á milli samhliða prófana í sama meðferðarhópnum vikulega. 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 annaðhvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum. Einnig ætti að halda fráviksstuðli mældu prófunarstyrkleikanna á öllu prófunartímabilinu innan meðhöndlunar við 20% eða minna í hverjum styrkleika. Ef mældu styrkleikarnir haldast ekki innan 80–120% af nafnstyrknum (t.d. við prófun á mjög lífbrjótanlegum eða ásogandi íðefnum) skal ákvarða hrifstyrkina og gefa þá upp í hlutfalli við meðaltalsstyrkleikann fyrir gegnumstreymisprófanir.

36. Streymi þynningarvatns og stofnlausnar skal athugað með viðeigandi millibili (t.d. þrisvar í viku) allan tímann meðan váhrif standa yfir. Ef um er að ræða íðefni sem ekki er hægt að greina við suma eða alla nafnstyrkleikana (t.d. út af hröðu niðurbroti eða ásogi í prófunarkerjunum eða vegna greinilegrar uppsöfnunar íðefna í skrokkum dýra sem verða fyrir váhrifum) er mælt með því að endurnýjunartíðni prófunarlausnarinnar í hverju keri sé aðlöguð til að halda prófunarstyrkleikum eins stöðugum og unnt er.

Athuganir og endapunktamælingar

37. Endapunktar sem eru metnir meðan váhrifin standa yfir eru þeir sem gefa vísbendingu um eiturhrif, þ.m.t. dánartala, óeðlilegt atferli, s.s. klínísk einkenni um sjúkdóm og/eða almenn eiturhrif, og ákvörðun á vexti (lengd og þyngd) sem og meinafræðilegir endapunktar sem gætu verið svar við bæði almennum eiturhrifum og verkunarhætti innkirtla sem beinist að estrógen-, andrógen- eða skjaldkirtilsbundnum ferlum. Þar að auki má mæla vítellógenínstyrk í blóðvökva valkvætt við lok greiningarinnar. Mæling á vítellógeníni getur verið gagnleg til að skilja rannsóknarniðurstöður í tengslum við gangvirki innkirtlastarfsemi þegar grunur er um etýlendíklóríð (EDC). Endapunktar og tímasetning mælinga er tekin saman í töflu 1.

Tafla 1

Yfirlit yfir endapunkta í rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)

Endapunktar (*)	Daglega	Sýnataka meðan á greiningunni stendur (sýnataka úr lirfum)	Lok prófunar (sýnataka úr ungviði)
Dánartala og afbrigðileiki	X		
Á tímabilinu til 62. NF-stigs		X	
Vefja(meina)fræði (skjaldkirtill)		X	
Formmælingar (aukning í þyngd og lengd)		X	X
Lifrar-/líkamsstuðull (e. *liver-somatic index* (LSI))			X
Erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll			X
Vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtlar, kynrásir, nýru og lifur)			X
Vítellógenín (valkvætt)			X

(*) Allir endapunktar eru greindir á tölfræðilegan hátt.

Dánartala og daglegar athuganir

38. Leitað skal að dauðum dýrum daglega í öllum prófunartönkum og skrá dánartölu fyrir hvern tank. Fjarlægja skal dauð dýr úr prófunartanknum um leið og eftir þeim er tekið. Þroskastig dauðu dýranna skal flokkað sem fyrir 58. NF-stig (áður en framfætur koma fram), 58. NF-stig til 62. NF-stigs, 63. NF stig til 66. NF-stigs (á milli 62. NF-stigs og algerrar halarýrnunar) eða eftir 66. NF-stig (eftir lirfustigið). Dánarhlutfall yfir 20% getur bent til þess að prófunarskilyrði séu óviðeigandi eða til augljósra eiturhrifa prófunaríðefnisins. Dýrunum hættir til að vera viðkvæmust fyrir atvikum sem valda dauða án íðefna á fyrstu dögum þroskunar eftir got og meðan myndbreyting stendur sem hæst. Viðmiðungargögnin gætu sýnt fram á slíkar dánartölur.

39. Þar að auki skal skrá ef vart verður við óeðlilegt atferli, vansköpun sem sést mjög greinilega (t.d. hryggskekkju) eða vefjaskemmdir. Telja skal hversu oft hryggskekkja kemur fyrir (tíðni) og flokka m.t.t. alvarleika (t.d. ekki áberandi – EÁ, hverfandi– 1, í meðallagi – 2, alvarleg – 3; 8. viðbætir). Reynt skal að tryggja að algengi hryggskekkju í meðallagi og alvarlegrar hryggskekkju sé takmarkað (t.d. undir 10% í samanburðarhópum) í allri rannsókninni þó að hærra algengi afbrigðileika í samanburðarhópum sé ekki endilega ástæða til að stöðva prófunina. Eðlilegt atferli dýra á lirfustigi einkennist af því að þau haldast á floti í vatnssúlunni með halann ofar hausnum, slá halaugganum taktfast til, koma reglulega upp á yfirborðið til að anda og bregðast við áreiti. Óeðlilegt atferli tekur m.a. til þess að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið og sýna engin viðbrögð við áreiti. Til viðbótar við framangreint óeðlilegt atferli skal skrá mikinn mun á fóðuráti milli meðferðarhópa hjá dýrum eftir myndbreytingu. Mikil vansköpun og vefjaskemmdir geta tekið til formfræðilegs afbrigðileika (t.d. vanskapaðir útlimir), blæðandi vefjaskemmda, bjúgs á kvið og bakteríu- eða sveppasýkingar, svo að eitthvað sé nefnt. Vefjaskemmdir sem koma fram á haus ungviðis, rétt fyrir aftan nasirnar, geta verið merki um að rakastig sé ófullnægjandi. Þessar greiningar eru eigindlegar og líta skal svo á að þær svari til klínískra einkenna um sjúkdóm/streitu og þær skulu gerðar með samanburði við samanburðardýrin. Ef þetta kemur oftar fyrir í váhrifatönkum en í samanburðartönkum skal líta á það sem sannanir fyrir augljósum eiturhrifum.

Taka undirsýna úr lirfum

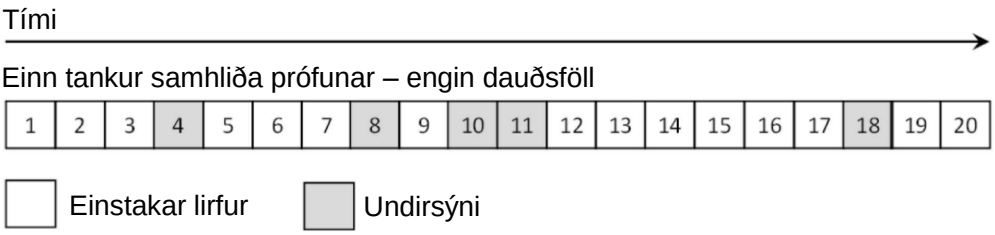
Yfirlit yfir töku undirsýna úr lirfum:

40. Fjarlægja skal halakörtur sem hafa náð 62. NF-stigi úr tönkunum og annaðhvort taka sýni úr þeim eða flytja þær yfir í næsta hluta váhrifanna í nýjum tanki eða aðskilja þær með skilrúmi algerlega frá öðrum halakörtum sem eftir eru í sama tanki. Halakörtur eru athugaðar daglega og rannsóknardagurinn, þegar einstakar halakörtur ná 62. NF-stigi, er skráður. Sá einkennandi eiginleiki sem notaður er í þessu mati er lögun höfuðsins. Þegar stærð höfuðsins hefur minnkað þannig að það er sjónrænt séð u.þ.b. af sömu breidd og bolur halakörtunnar og framfæturnir eru til móts við miðju hjartans telst sá einstaklingur hafa náð 62. NF-stiginu.

41. Markmiðið er að taka sýni úr samtals fimm halakörtum á 62. NF-stigi í hverjum tanki samhliða prófunar. Þetta skal gert algerlega af handahófi en ákvörðunin um það tekin fyrir fram. Tilbúið dæmi um tank samhliða prófunar er sýnt á mynd 1. Ef 20 lifandi halakörtur eru í tilteknum tanki þegar fyrsti einstaklingurinn nær 62. NF-stigi skal velja fimm tölur af handahófi á bilinu 1–20. Halakarta #1 er fyrsti einstaklingurinn til að ná 62. NF-stigi og halakarta #20 er síðasti einstaklingurinn í tanknum til að ná 62. NF-stigi. Ef 18 lifandi lirfur eru í tanki skal á sama hátt velja fimm tölur af handahófi af bilinu 1–18. Þetta skal framkvæmt fyrir hvern tank samhliða prófunar þegar fyrsti einstaklingurinn í prófuninni nær 62. NF-stigi. Ef dauðsföll verða við sýnatöku á 62. NF-stigi verður að endurdreifa eftirstandandi sýnum af handahófi, byggt á því hversu margar lirfur eru eftir < 62. NF-stigi og hversu mörg sýni til viðbótar þarf til að ná samtals fimm sýnum úr þeirri samhliða prófun. Á þeim degi þegar halakarta nær 62. NF-stigi er flett upp í sýnatökutöflunni sem var gerð til að ákvarða hvort tekið er sýni úr viðkomandi einstaklingi eða hvort hann er algerlega aðskilinn frá halakörtunum sem eftir eru til áframhaldandi váhrifa. Í dæminu sem er gefið (mynd 1) er fyrsti einstaklingurinn sem nær 62. NF-stigi (þ.e. reitur #1) algerlega aðskilinn frá öðrum lirfum, váhrifum er haldið áfram og rannsóknardagurinn þegar viðkomandi einstaklingur nær 62. NF-stiginu er skráður. Því næst eru einstaklingar #2 og #3 meðhöndlaðir á sama hátt og #1 og síðan er tekið sýni úr einstaklingi nr. #4 vegna vaxtar og vefjafræði skjaldkirtils (samkvæmt þessu dæmi). Þessu verkferli er haldið áfram þangað til 20. einstaklingurinn er annaðhvort settur með öðrum einstaklingum eftir 62. NF-stigið eða tekið er sýni úr honum. Handahófsaðferðin, sem er notuð, verður að gefa hverju dýri í prófuninni jafn miklar líkur á að vera valið. Þessu er hægt að ná fram með því að nota hvaða handahófsaðferð sem er en útheimtir einnig að hver halakarta um sig sé veidd í háf á einhverjum punkti á öllu undirsýnatökutímabili 62. NF-stigsins.

Mynd 1

Tilbúið dæmi um sýnatökuáætlun á 62. NF-stigi í einum tanki samhliða prófunar



42. Endapunktarnir sem fást með töku undirsýna úr lirfum eru: 1) tími til 62. NF-stigs (þ.e. fjöldi daga milli frjóvgunar og 62. NF-stigs), 2) ytri afbrigðileiki, 3) formmælingar (t.d. þyngd og lengd) og 4) vefjafræði skjaldkirtils.

Aflífun halakarta á mannúðlegan hátt

43. Halakörturnar á 62. NF-stigi í undirsýninu (5 einstaklingar í hverri samhliða prófun) skulu aflífaðar með því að hafa halakörturnar á kafi í 30 mínútur í viðeigandi magni (t.d. 500 ml) af svæfingarlausn (t.d. 0,3% lausn af MS-222, tríkaínmetansúlfónati, CAS.886-86-2). MS-222-lausnin skal jöfnuð með natríumbíkarbónati þannig að pH-gildið verði u.þ.b. 7,0 vegna þess að ójöfnuð MS-222-lausn er súr og ertir húð froskanna sem leiðir til lélegs ísogs og óþarfa viðbótarstreitu fyrir lífverurnar.

44. Halakarta er tekin úr tilraunakerinu með háf og flutt (sett) í aflífunarlausn. Dýrið er aflífað á tilhlýðilegan hátt og er tilbúið til krufningar þegar það bregst ekki við ytra áreiti, t.d. þegar klipið er í afturfótinn með töng.

Formmælingar (þyngd og lengd)

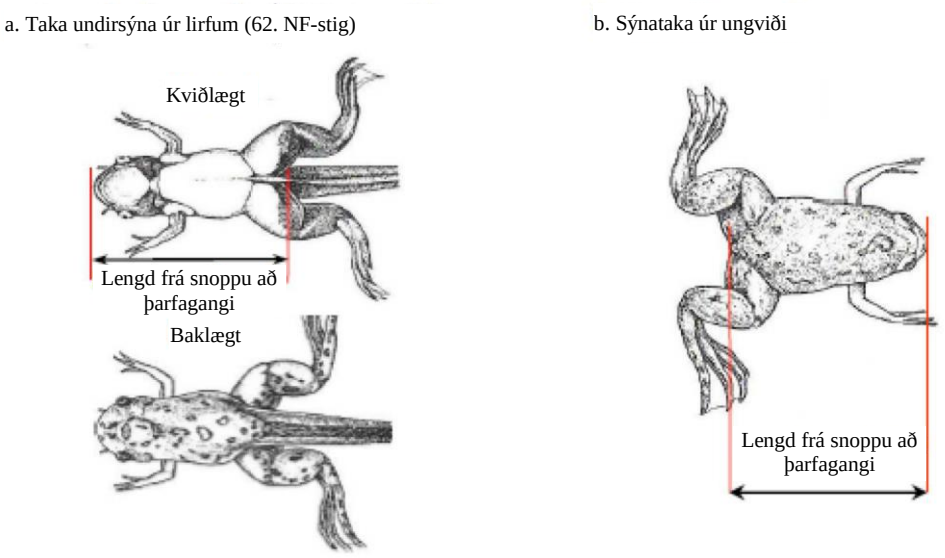
45. Mælingar á blautvigt (að næsta mg) og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (að næsta 0,1 mm) hverrar halakörtu skulu gerðar tafarlaust eftir að hún hættir að sýna viðbrögð eftir svæfingu (mynd 2a). Nota má myndgreiningarhugbúnað til að mæla lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) á ljósmynd. Halakörtur skulu þerraðar áður en þær eru vigtaðar til að fjarlægja umframvatn sem loðir við þær. Eftir mælingar á skrokkstærð (þyngd og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL)) skal gera grein fyrir eða skrá allan stórsæjan, formfræðilegan afbrigðileika og/eða klínísk einkenni um eiturhrif, s.s. hryggskekkju (sjá 8. viðbæti), depilblæðingu og blæðingu og mælt er með stafrænni skráningu. Athygli er vakin á því að depilblæðing er lítil rauð eða fjólublá blæðing í háræðunum.

Vefjasöfnun og festing

46. Skjaldkirtill lirfanna úr undirsýninu fer í vefjafræðilegt mat. Neðri hluti búksins, aftan við framfæturna, er fjarlægður og honum fleygt. Snyrtur skrokkurinn er festur í Davidson-festiefni. Magn festiefnisins í ílátinu skal vera a.m.k. tífalt meira en áætlað rúmmál vefjanna. Viðeigandi hristingur eða hringrás festiefnisins skal nást til að festa vefina, sem verið er að rannsaka, á fullnægjandi hátt. Allir vefir eru hafðir í Davidson-festiefninu í a.m.k. 48 klst. en ekki lengur en í 96 klst og þá eru þeir skolaðir í afjónuðu vatni og geymdir í 10% formalíni með hlutlausum jafna (1. og 29. heimild).

Vefjafræði skjaldkirtils

47. Skjaldkirtlar allra undirsýna úr lirfum (festur vefur) fara í vefjafræðilegt mat, þ.e. sjúkdómsgreiningu og flokkun á alvarleika (29.–30. heimild).



Mynd 2 Kennimörk við mælingar á lengd frá snoppu að þarfagangi í rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) á 62. NF-stigi a) og ungfroska b). Einkennandi eiginleikar 62. NF-stigs a): hausinn er jafnbreiður og bolurinn, lyktartaugin er styttri en þvermál lyktarklumbunnar (baklægt séð) og framfæturnir eru til móts við miðju hjartans (kviðlægt séð) Myndirnar eru aðlagaðar frá Nieuwkoop og Faber (1994).

Váhrifum á lirfur lýkur

48. Miðað við upphaflegan fjölda halakarta er búist við því að lágt hlutfall einstaklinga þroskist ekki eðlilega og ljúki ekki myndbreytingu (66. NF-stigi) innan hæfilegs tíma. Váhrifin í lirfuhlutanum skulu ekki standa lengur en í 70 daga. Aflífa skal allar halakörtur sem eftir eru við lok þess tímabils (sjá 43. lið), mæla blautvigt þeirra og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL), ákvarða þroskunarstigið samkvæmt Nieuwkoop and Faber, 1994, og skrá allan afbrigðileika í þroska.

Förgun eftir 66. NF-stigið

49. Tíu einstaklingar í hverjum tanki skulu halda áfram frá 66. NF-stigi (alger halavisnun) til loka váhrifa. Eftir að öll dýrin hafa náð 66. NF-stigi eða eftir 70 daga (hvort sem verður fyrr) skal förgun fara fram. Eftir 66. NF-stigið skal velja dýr af handahófi sem halda ekki áfram að verða fyrir váhrifum.

50. Dýr sem eru ekki valin til áframhaldandi váhrifa eru aflífuð (sjá 43. lið). Mælingar á þroskastigi, blautvigt og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (mynd 2b) og stórsæ krufning eru framkvæmdar á hverju dýri. Svipfarslegt kyn (byggt á formi og byggingu kynkirtla) er skráð sem kvendýr, karldýr eða óákveðið.

Sýnataka úr ungviði

Yfirlit yfir sýnatöku úr ungviði

51. Dýrin sem eru eftir eru látin verða fyrir váhrifum áfram þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í þynningarvatninu (og/eða í samanburði með leysi, ef við á) í samanburðinum. Við lok váhrifatímabilsins eru dýrin sem eftir eru (að hámarki 10 froskar í hverri samhliða prófun) aflífuð og mismunandi endapunktar mældir eða metnir og skráðir: 1) formmælingar (þyngd og lengd), 2) svipfarsleg/arfgerðarleg kynjahlutföll, 3) þyngd lifrar (lifrar-/líkamsstuðull (LSI)), 4) vefjameinafræðileg rannsókn (kynkirtlar, kynrásir, lifur og nýru) og valkvætt 5) vítellógenín í blóðvökva.

Aflífun froska á mannúðlegan hátt

52. Sýnishornin af ungviðinu, froskar eftir myndbreytingu, eru aflífuð með því að sprauta svæfingarlyfi í kviðarholið, t.d. 10% MS-222 í viðeigandi fosfatjafnaðri lausn. Taka má sýni úr froskum eftir að þeir eru hættir að sýna viðbrögð (yfirleitt u.þ.b. 2 mínútum eftir innsprautun ef 10% af MS-222 eru notuð í skammti sem nemur 0,01 ml á hvert g af froski). Þó að hægt væri að setja ungfroska á kaf í svæfingarlyf með hærri styrk (MS-222) hefur reynslan sýnt að það tekur lengri tíma að svæfa þá með því að nota þessa aðferð og tímalengdin er e.t.v. ekki fullnægjandi til að taka megi sýni. Innsprautun hefur í för með sér skilvirka og skjóta aflífun fyrir sýnatöku. Til að tryggja að dýrin séu dauð skal sýnataka ekki hefjast fyrr en staðfest hefur verið að froskarnir sýni engin viðbrögð. Ef froskar sýna merki um talsverðar þjáningar (mjög alvarlegar og hægt er að segja með vissu til um dauða þeirra) og eru taldir dauðvona skal svæfa og aflífa dýrin og meðhöndla það sem dánartölur í gagnagreiningunni. Ef froskur er aflífaður vegna sjúkdómstilviks skal skrá það og gera grein fyrir því. Unnt er að geyma frosk til vefjameinafræðilegrar greiningar (froskurinn er festur til að vefjameinafræðigreining sé möguleg), háð því hvenær í rannsókninni froskurinn er aflífaður.

Formmælingar (þyngd og lengd)

53. Mælingar á blautvigt og lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL) (mynd 2b) eru nákvæmlega eins og þær sem eru útlistaðar fyrir töku undirsýna úr lirfum.

Vítellógenín í blóðvökva (valkostur)

54. Vítellógenín er almennt viðurkennt lífmerki sem stafar af váhrifum af völdum estrógenvirkra íðefna. Innan rannsóknarinnar á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er valkvætt að mæla vítellógenín í blóðvökva úr sýnum úr ungviði (þetta getur verið sérlega mikilvægt ef grunur leikur á um að íðefnið sé estrógenvirkt).

55. Afturfæturnir á aflífuðu ungviði eru skornir af og blóðinu safnað með heparínmeðhöndlaðri hárpípu (þó getur annars konar aðferð við blóðsöfnun verið hentug, s.s. stunga í hjartað). Blóðið er flutt yfir í örskilvinduglas (t.d. 1,5 ml að rúmmáli) og skilið í skilvindu til að ná blóðvökvanum. Geyma skal blóðvökvasýnin við -70 °C eða lægra þangað til vítellógenínið er ákvarðað. Hægt er að mæla styrk vítellógeníns í blóðvökva með ELISA-prófunaraðferð (6. viðbætir) eða með staðgönguaðferð, s.s. massagreiningu. Tegundarsértæk mótefni eru ákjósanlegust vegna meira næmis.

Ákvörðun á erfðafræðilegu kyni

56. Erfðafræðilegt kyn hvers ungfrosks er metið, byggt á merkjum sem Yoshimoto o.fl. þróuðu. (11. heimild). Til að ákvarða erfðafræðilegt kyn er hluti annars afturfótar (eða hann allur) (eða einhverjum öðrum vef) sem er fjarlægður við krufningu tekinn og geymdur í örskilvinduglasi (hægt er að taka sýni úr hvaða vef froska sem er). Hægt er að geyma vef við -20 °C eða lægra þangað til einangrun deoxýríbósakjarnsýru (DNA) fer fram. Hægt er að einangra DNA úr vefjum með settum sem fást á almennum markaði og greining á því hvort merkið er fyrir hendi eða ekki er gerð með kjarnsýrumögnunaraðferð (5. viðbætir). Almennt er samsvörun milli vefjafræðilegs kyns og arfgerðar í öllum samanburðardýrum yfir 95% á þeim tímapunkti þegar sýni eru tekin úr ungviði í samanburðarhópum.

Vefjasöfnun og festing fyrir vefjameinafræðilega rannsókn

57. Kynkirtlar, kynrásir, nýru og lifur eru tekin til vefjafræðilegrar greiningar þegar síðasta sýnatakan fer fram. Kviðarholið er opnað og lifrin skorin úr og vigtuð. Næst eru meltingarfærin (t.d. magi, garnir) fjarlægð varlega úr neðra kviðarholinu til að kynkirtlar, nýru og kynrásir komi í ljós. Skrá skal allan stórsæjan, formfræðilegan afbrigðileika kynkirtlanna. Að lokum skal fjarlægja afturfæturna ef þeir hafa ekki verið teknir áður til blóðsöfnunar. Setja skal lifrar sem teknar eru og þá skrokka sem hafa kynkirtlana á sínum stað tafarlaust í Davidson-festiefni. Magn festiefnisins í ílátinu skal vera a.m.k. tífalt meira en áætlað rúmmál vefjanna. Allir vefir eru geymdir í Davidson-festiefninu í a.m.k. 48 klst. en ekki lengur en 96 klst og þá eru þeir skolaðir í afjónuðu vatni og geymdir í 10% formalíni með hlutlausum jafna (1. og 29. heimild).

Vefjameinafræðileg rannsókn

58. Hvert sýni úr ungviði er metið á vefjafræðilegan hátt m.t.t. sjúkdóma í kynkirtla-, kynrása-, nýrna- og lifrarvef, þ.e. sjúkdómsgreining og flokkun á alvarleika (32. heimild). Svipfar kynkirtla er einnig leitt út frá þessu mati (t.d. eggjastokkar, eistu, millikyn) og hægt er að nota þessar athuganir ásamt einstökum mælingum á erfðafræðilegu kyni til að reikna út svipfarsleg/arfgerðarleg kynjahlutföll.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Tölfræðileg greining

59. Rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) myndar þrenns konar gögn til tölfræðilegrar greiningar. 1) magnbundin samfelld gögn (þyngd, lengd frá snoppu að þarfagangi (SVL), lifrar-/líkamsstuðull (LSI),vítellógenín), 2) lifunargögn (e. *time-to-event data*) fyrir þroskunarhraða (þ.e. dagar frá upphafi greiningar til 62. NF-stigs) og 3) raðgögn í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga frá vefjafræðilegu mati.

60. Mælt er með því að tilhögun prófunarinnar og val á tölfræðilegri prófun veiti nægilegan styrk til að greina breytingar á endapunktum sem hafa líffræðilega þýðingu ef gera skal grein fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif eða ECx. Æskilegast er að tölfræðilegar greiningar á gögnunum (yfirleitt á grundvelli meðaltals samhliða prófunar) séu samkvæmt aðferðum sem lýst er í skjalinu „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (33. heimild). Í 7. viðbæti við þessa prófunaraðferð kemur fram ákvarðanatökutré fyrir ráðlagða tölfræðilega greiningu og leiðbeiningar um meðferð gagna og við val á því tölfræðilegu prófi eða líkani sem á best við til að nota í rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA).

61. Gögnin úr sýnatökunni á ungviðinu (t.d. vöxtur, lifrar-/líkamsstuðull (LSI)) skulu greind aðskilið fyrir hvert arfgerðarlegt kyn þar eð arfgerðarlegt kyn er ákvarðað fyrir alla froska.

Atriði varðandi gagnagreiningu

Notkun á ótryggum samhliða prófunum og meðferðum

62. Samhliða prófanir og meðferðir gera orðið ótryggar vegna afbrigðilegrar dánartíðni af völdum augljósra eiturhrifa, sjúkdóms eða tæknilegrar villu. Ef samhliða prófun er ótrygg vegna sjúkdóms eða tæknilegrar villu ættu þrjár tryggar meðferðir með þremur tryggum samhliða prófunum að vera tiltækar til greiningar. Ef augljós eiturhrif eiga sér stað í meðferð(um) með háum styrk er ákjósanlegt að a.m.k. þrjár tryggar meðferðir með þremur tryggum samhliða prófunum séu tiltækar til greiningar (í samræmi við nálgun fyrir hámarksþolsstyrk í OECD-viðmiðunarreglum um prófanir (34. heimild). Til viðbótar við dánartölur geta augljós merki eiturhrifa falið í sér áhrif á atferli (t.d. að fljóta á yfirborðinu, liggja á botni tanksins, öfugar eða skrykkjóttar sundhreyfingar, fara ekki upp á yfirborðið) formfræðilegar vefjaskemmdir (t.d. blæðandi vefjaskemmdir, bjúgur á kvið) eða hömlun á eðlilegum viðbrögðum við fóðrun í eigindlegum samanburði við samanburðardýr.

Samanburður með leysi

63. Við lok prófunarinnar skal framkvæma mat á hugsanlegum áhrifum leysisins (ef hann er notaður). Þetta er gert með tölfræðilegum samanburði á samanburðarhópnum með leysinum og samanburðarhópnum með þynningarvatninu. Mikilvægustu endapunktarnir til athugunar í þessari greiningu eru vaxtarákvörðunarþættir (þyngd og lengd) þar eð almenn eiturhrif geta haft áhrif á þá. Ef tölfræðilega marktækur munur kemur fram milli þessara endapunkta í samanburðarhópunum með þynningarvatni og samanburðarhópunum með leysi skal nota besta sérfræðiálit til að ákvarða hvort gildi prófunarinnar er teflt í tvísýnu. Ef það er munur á samanburðarhópunum tveimur skal bera meðferðina sem varð fyrir váhrifum af íðefninu saman við samanburðarhópinn með leysi nema vitað sé að samanburður við samanburðarhóp með þynningarvatni sé ákjósanlegri. Ef enginn tölfræðilega marktækur munur er milli samanburðarhópanna tveggja er mælt með því að meðferðir sem verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu séu bornar saman við hópuð sýni (samanburðarhópar með leysi og samanburðarhópar með þynningarvatni) nema vitað sé að samanburður við annaðhvort samanburðarhópinn með leysi eða samanburðarhópinn með þynningarvatni sé ákjósanlegri.

Prófunarskýrsla

64. Eftirtalið skal vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

— Eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar.

— 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.

Prófunartegund:

— Vísindaheiti, stofn ef hann liggur fyrir, uppruni frjóvguðu eggjanna og aðferð við að afla þeirra og meðhöndlun eftir það.

— Tíðni hryggskekkju í rannsóknarsögulegum samanburði fyrir stofnræktina sem er notuð.

Prófunarskilyrði:

— Ljóslota eða ljóslotur.

— Tilhögun prófunar (t.d. stærð kers, efni og rúmmál vatns, fjöldi prófunarkerja og samhliða prófana, fjöldi prófunarlífvera í hverri samhliða prófun).

— 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 prófunaríðefnisins (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 joðs, 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.

— Nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mæligilda og staðalfrávik þeirra.

— Gæði vatns í prófunarílátum, sýrustig, hitastig (daglega) og styrkur uppleysts súrefnis.

— Nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruna, magn sem er gefið og hve oft er gefið).

Niðurstöður:

— Sannanir fyrir því að samanburðir uppfylli gildisviðmiðanir.

— Gögn fyrir samanburðinn (að viðbættum samanburði með leysi þegar hann er notaður) og meðferðarhópana sem hér segir: dánartölur og afbrigðileiki sem koma í ljós, tími til 62. NF-stigs, vefjafræðilegt mat á skjaldkirtli (einungis sýni úr lirfum), vöxtur (þyngd og lengd), lifrar-/líkamsstuðull (LSI) (einungis sýni úr ungviði), erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll (einungis sýni úr ungviði), niðurstöður úr vefjameinafræðilegu mati á kynkirtlum, kynrásum, nýrum og lifur (einungis sýni úr ungviði) og vítellógenín í blóðvökva (einungis sýni úr ungviði, ef það er tekið).

— Aðferð við tölfræðilega greiningu og meðferð gagna (tölfræðileg prófun eða líkan sem er notað).

— Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) fyrir hverja svörun sem metin er.

— Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) fyrir hverja svörun sem er metin (við $\alpha = 0{,}05$); ECx fyrir hverja svörun sem metin er, ef við á, og öryggisbil (t.d. 95%) og línurit aðlagaða líkansins sem er notað við útreikningana, ferli styrkháðrar svörunar, formúla aðhvarfslíkans, áætlaðar líkanbreytur og staðalskekkjur þeirra.

— Öll frávik frá prófunaraðferðinni og frávik frá samþykktarviðmiðunum og atriði sem varða mögulegar afleiðingar á niðurstöðu prófunarinnar.

65. Að því er varðar niðurstöður mælinga á endapunktum skal leggja fram meðalgildi og staðalfrávik þeirra (bæði á grundvelli samhliða prófana og styrks, ef unnt er).

66. Miðgildistími til 62. NF-stigs í samanburðarhópunum skal reiknaður út og settur fram sem meðaltal miðgildis samhliða prófana og staðalfrávik þeirra. Á sama hátt, að því er varðar meðferðir, skal miðgildi meðferðar reiknað út og sett fram sem meðaltal miðgildis samhliða prófana og staðalfrávik þeirra.

HEIMILDIR

1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of Xenopus laevis (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 16–27.

5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in Xenopus. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.

6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in Xenopus laevis Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1 565.

7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in Xenopus Laevis Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.

8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in Xenopus. Zoological Science 16: 335–340.

9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of Xenopus laevis, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1 411.

10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, Xenopus tropicalis, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.

11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in Xenopus Laevis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469–2 474.

12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: Xenopus tropicalis. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female Xenopus laevis. Journal of Neurobiology 37: 441–448.

14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of Xenopus Laevis. Aquatic Toxicology 84: 321–327.

15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on Xenopus Tropicalis in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.

16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

17) Kafli C.4 í þessum viðauka, Prófun á auðlífbrjótanleika.

18) Kafli C.29 í þessum viðauka, Auðlífbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum (kollrúmsprófun).

19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.

20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.

21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog Xenopus Laevis. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

25) Kafli C.38 í þessum viðauka, Greining á myndbreytingu hjá froskdýrum.

26) Kafli C.48 í þessum viðauka, Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum.

27) Kafli C.41 í þessum viðauka, Prófun á kynþroska fiska.

28) Kafli C.49 í þessum viðauka, Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska.

29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of X. laevis Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

1. viðbætir.

SKILGREININGAR

Afgerandi endapunktur: Veldur áhrifum á stofninn.

Íðefni: Efni eða blanda.

ELISA: ELISA-prófun.

ECx: (Hrifstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC50 sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

def: dagar eftir frjóvgun

Gegnumstreymisprófun: Prófun með samfelldu streymi prófunarlausna gegnum prófunarkerfið meðan váhrif standa yfir.

UHK-öxull (e. *HPG axis*): Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull.

IUPAC: Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti prófaði 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 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 7. viðbæti.

Miðgildisbanastyrkur (LC50): Styrkur prófunaríðefnis sem talinn er banvænn fyrir 50% prófunarlífveranna meðan prófunin stendur yfir.

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.

SMILES: SMILES-kerfið.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Vítellógenín (VTG): fosfólípóglýkóprótínforefni eggjarauðuprótíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggbærum tegundum.

2. viðbætir.

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	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

3. viðbætir.

PRÓFUNARSKILYRÐI FYRIR RANNSÓKN Á VEXTI OG ÞROSKA FROSKDÝRALIRFA (LAGDA)

1. Prófunartegund	*Xenopus laevis*
2. Tegund prófunar	Samfellt gegnumstreymi.
3. Vatnshitastig	Nafnhitastig er 21 °C. Meðalhitastig meðan prófunin stendur yfir er 21 ± 1 C (munur milli tanka samhliða prófana/meðferðartanka skal ekki fara yfir 1,0 °C)
4. Lýsing	Flúrperur (breitt róf) 600–2000 lúx (lúmen/m2) við vatnsyfirborðið
5. Ljóslota	Birta í 12 klst., myrkur í 12 klst.
6. Rúmmál prófunarlausnar og prófunarker (tankur)	4–10 l (a.m.k. 10–15 cm vatnsdýpt) Tankur úr gleri eða ryðfríu stáli
7. Rúmmálsútskipti prófunarlausna	Stöðug, bæði að því er varðar að viðhalda líffræðilegu ástandi og íðefnaváhrifum (t.d. 5 rúmmálsendurnýjanir í tanknum á dag)
8. Aldur prófunarlífvera við upphaf	Nieuwkoop og Faber (NF-stig) 8.–10.
9. Fjöldi lífvera í hverri samhliða prófun	20 dýr (fósturvísar)/tankur (samhliða prófun) við upphaf váhrifa og 10 dýr (ungviði/tankur(samhliða prófun) eftir 66. NF-stigið til loka váhrifa.
10. Fjöldi meðferða	Að minnsta kosti 4 prófunaríðefnameðferðir auk viðeigandi samanburðarprófunar eða -prófana
11. Fjöldi samhliða prófana á hverja meðferð	Fjórar samhliða prófanir á hverja meðferð fyrir prófunaríðefni og 8 samhliða prófanir fyrir samanburð(i)
12. Fjöldi lífvera á hvern prófunarstyrk	Að minnsta kosti 80 dýr á hverja meðferð fyrir prófunaríðefni og a.m.k. 160 dýr fyrir samanburð(i)
13. Þynningarvatn	Allt vatn sem gerir *X. laevis* kleift að vaxa og þroskast eðlilega (t.d. lindarvatn eða viðarkolasíað kranavatn)
14. Loftun	Ekki krafist en loftun tanka kann að vera nauðsynleg ef gildi uppleysts súrefnis fara niður fyrir ráðlögð gildi og streymi prófunarlausnar er í hámarki.
15. Uppleyst súrefni í prófunarlausn	Uppleyst súrefni: ≥ 40% af mettunargildi lofts eða ≥ 3,5 mg/l

16. Sýrustig í prófunarlausn	6.5–8.5 (munur milli tanka samhliða prófana og meðhöndlunartanka skal ekki fara yfir 0,5)
17. Harka og basavirkni í prófunarlausn	10–250 mg CaCO3/l
18. Fóðrunarfyrirkomulag	(Sjá 4. viðbæti)
19. Váhrifatímabil	Frá 8.–10. NF-stigi þangað til 10 vikum eftir miðgildistímann til 62. NF-stigs í samanburðarhópi í vatni og/eða með leysi (að hámarki 17 vikur)
20. Líffræðilegir endapunktar	Dánartölur (og afbrigðilegt útlit), tími til 62. NF-stigs (sýni úr lirfum), vefjafræðilegt mat á skjaldkirtli (sýni úr lirfum) vöxtur (þyngd og lengd), lifrar-/líkamsstuðull (LSI) (sýni úr ungviði), erfðafræðileg/svipfarsleg kynjahlutföll (sýni úr ungviði), vefjameinafræðileg rannsókn á kynkirtlum, kynrásum, nýrum og lifur (sýni úr ungviði) og vítellógenín í blóðvökva (sýni úr ungviði, valkvætt)
21. Gildisviðmiðanir prófunar	Uppleyst súrefni skal vera > 40% af mettunargildi lofts; meðalhitastig vatns skal vera 21 ± 1 C og munur milli tanka samhliða prófana og meðferðartanka skal vera < 1.0 C; pH-gildi prófunarlausnarinnar skal vera á bilinu 6,5 til 8,5; dánarhlutfall í samanburði skal vera ≤ 20% í hverri samhliða prófun og meðaltíminn til 62. NF-stigs í samanburðinum skal vera ≤ 45 dagar; meðalþyngd prófunarlífvera á 62. NF-stigi og við lok greiningarinnar í samanburði og samanburði með leysi (ef hann er notaður) skal ná 1,0 ± 0,2 og 11,5 ± 3 g, eftir því sem við á; gögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðefnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligildanna.

4. viðbætir.

FÓÐRUNARFYRIRKOMULAG

Það skal bent á að þótt þetta fóðrunarfyrirkomulag sé ráðlagt eru aðrir kostir heimilaðir að því tilskildu að prófunarlífverurnar vaxi og þroskist á viðeigandi hraða.

Fóðrun lirfa

Tilreiðsla á fóðri fyrir lirfur

A. 1:1 (rúmmálshlutfall) upphafsfóður fyrir silung: þörungar/TetraFin® (eða jafngildi þess)

1. Upphafsfóður fyrir silung: blandið saman 50 g af upphafsfóðri fyrir silung (fíngerð korn eða duft) og 300 ml af hentugu síuðu vatni í blandara á hæstu stillingu í 20 sekúndur

2. Blanda af þörungum/TetraFin® (eða jafngildi þess): blandið saman 12 g af *Spirulina* þörungaskífum og 500 ml af síuðu vatni í blandara á hæstu stillingu í 40 sekúndur, blandið 12 g af TetraFin® (eða jafngildi þess) í 500 ml af síuðu vatni og blandið síðan öllu þessu saman til að búa til 1 l af 12 g/l af *Spirulina* þörungum og 12 g/l af TetraFin® (eða jafngildi þess)

3. Blandið saman jafnmiklu magni af blönduðu upphafsfóðri fyrir silung og blöndu af þörungum/TetraFin® (eða jafngildi þess)

B. Saltvatnsrækjur:

15 ml af saltvatnsrækjuhrognum eru látin klekjast út í 1 l af saltvatni (tilreitt með því að bæta 20 ml af NaCl í 1 l af afjónuðu vatni). Eftir loftun í 24 klst. við stofuhita í stöðugri birtu eru saltvatnsrækjurnar teknar. Saltvatnsrækjurnar fá að sökkva til botns í stutta stund, 30 mínútur, með því að loftun er stöðvuð. Himnum sem fljóta upp á yfirborð ílátsins er hellt af og fleygt og rækjunum hellt gegnum viðeigandi síur og fyllt upp að 30 ml með síuðu vatni.

Aðferðarlýsing fóðrunar

Í töflu 1 er tilgreind tegund og magn fóðurs sem er notað á lirfustigum váhrifanna. Fóðra skal dýrin þrisvar á dag frá mánudegi til föstudags og einu sinni á dag um helgar.

Tafla 1

Fóðrunarfyrirkomulag fyrir lirfur af tegundinni *X. laevis* við gegnumstreymisskilyrði

Tími (*) (Eftir frjóvgun)	Upphafsfóður fyrir silung: þörungar/TetraFin® (eða jafngildi þess)		Saltvatnsrækjur	
	Virkur dagur (þrisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)	Virkur dagur (tvisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)
4.–14. dagur (á vikum 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (frá 8. degi til 15. dags) 1 ml (frá 16. degi)	0,5 ml (frá 8. degi til 15. dags) 1 ml (frá 16. degi)
(Vika 2)	0,67 ml	2,4 ml		
(Vika 3)	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
(Vika 4)	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Tími (*) (Eftir frjóvgun)	Upphafsfóður fyrir silung: þörungar/TetraFin® (eða jafngildi þess)		Saltvatnsrækjur	
	Virkur dagur (þrisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)	Virkur dagur (tvisvar á dag)	Helgi (einu sinni á dag)
(Vika 5)	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
(Vika 6)	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(Vika 7)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(Vikur 8–10)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Dagur 0 er skilgreindur sem sá dagur þegar inndæling æðabelgskynhormónavaka manna er gerð.

Umskipti í fóðri frá lirfum yfir í ungviði

Þegar lirfur ljúka myndbreytingu skipta þær yfir í fóður fyrir ungviði og samsetningunni er lýst hér á eftir. Meðan þessi umskipti eiga sér stað skal minnka lirfufóðrið eftir því sem ungviðisfóðrið er aukið. Þessu er hægt að ná fram með því að minnka lirfufóðrið hlutfallslega meðan ungviðisfóðrið er aukið hlutfallslega eftir því sem hver hópur með fimm halakörtum fer yfir 62. NF-stigið og nálgast það að ljúka myndbreytingunni á 66. NF-stiginu.

Fóðrun ungviðis

Fóður fyrir ungviði

Þegar myndbreytingu er lokið (66. stig) breytist fóðrunarfyrirkomulagið yfir í eingöngu sökkvandi fóður, af stærðinni 3/32 tommur, fyrir froska (Xenopus ExpressTM, FL, Bandaríkin) eða jafngildi þess.

Tilreiðsla muldra köggla fyrir umskipti frá lirfum yfir í ungviði

Sökkvandi fóðurkögglar fyrir froska eru settir í kaffikvörn eða blandara í stutta stund eða muldir með staut í mortéli til að minnka stærð kögglana um u.þ.b. 1/3. Ef það er unnið of mikið verður það að dufti og ráðið er frá því.

Aðferðarlýsing fóðrunar

Í töflu 2 er tilgreind tegund og magn fóðurs sem er notað á lífsstigum ungviðis og fullorðinna. Gefa skal dýrunum einu sinni á dag. Það skal bent á að meðan dýrin ganga í gegnum myndbreytingu fá þau áfram skammt af saltvatnsrækjunum þangað til > 95% af dýrunum hafa lokið myndbreytingunni.

Ekki skal fóðra dýrin þann dag sem prófun lýkur til þess að fóðrið trufli ekki þyngdarmælingarnar.

Tafla 2

Fóðrunarfyrirkomulag fyrir ungviði af tegundinni *X. laevis* við gegnumstreymisskilyrði Það skal bent á að dýr sem hafa ekki gengið í gegnum myndbreytingu, þ.m.t. dýr með tafða myndbreytingu vegna íðefnameðferðarinnar, geta ekki étið ómulda köggla.

Tími (*) (Vikur eftir miðgildisdag myndbreytingar)	Muldir kögglar (mg á hvern ungfrosk)	Heilir kögglar (mg á hvern ungfrosk)
Eftir því sem dýrin ljúka myndbreytingunni	25	0
(Vikur 0–1)	25	28
(Vikur 2–3)	0	110
(Vikur 4–5)	0	165
(Vikur 6–9)	0	220

(*) Fyrsti dagurinn í viku 0 er miðgildisdagur myndbreytingar hjá samanburðardýrum.

5. viðbætir.

ÁKVÖRÐUN Á ERFÐAFRÆÐILEGU KYNI (ERFÐAFRÆÐILEG KYNGREINING)

Aðferð við erfðafræðilega kyngreiningu *Xenopus laevis* er byggð á Yoshimoto o.fl. 2008. Nákvæmt verkferli við arfgerðargreiningu má finna í þeirri útgáfu, ef þörf krefur. Nota má staðgönguaðferðir (t.d. afkastamikla megindlega kjarnsýrumögnun (qPRC) í rauntíma) ef það er talið hentugt.

Vísar fyrir *X. laevis*

DM-W-merki

Fram: 5’-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3’

Bak: 5’-GGGCAGAGTCACATATACTG-3’

Jákvæður samanburður

Fram: 5’-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3’

Bak: 5’-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3’

DNA-hreinsun

Hreinsið DNA úr vöðva- eða húðvef með því að nota t.d. „Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit“ (bækl. # 69 506) eða svipaða vöru samkvæmt leiðbeiningum í setti. Hægt er að skola DNA út úr spunasúlunum með minna af jafnalausn til að fá sýni með meiri styrk ef það er talið nauðsynlegt fyrir kjarnsýrumögnun. Athygli er vakin á því að DNA er mjög stöðugt svo þess skal gætt að forðast víxlmengun sem gæti leitt til þess að karldýr séu ranglega greind sem kvendýr eða öfugt.

Kjarnsýrumögnun (PCR)

Aðferðalýsing fyrir sýni þar sem notað er JumpStart^{TM}Taq frá Sigma er útlistuð í **töflu 1**.

Tafla 1

Aðferðarlýsing fyrir sýni þar sem notað er JumpStart^{TM}Taq frá Sigma

Aðalblanda	1x (µl)	[Endanleg]
NFW (*)	11	—
10X jafnalausn	2,0	—
MgCl2 (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM hver)	0,4	200 µM
Merki framvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Merki bakvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Samanburður framvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM
Samanburður bakvísir (8 µM)	0,8	0,3 µM

Aðalblanda	1x (µl)	[Endanleg]
JumpStart™Taq	0,4	0,05 einingar/µl
DNA-mót	1,0	~200 pg/µl

(*) Vatn án núkleasa
Athugasemd: Þegar aðalblöndur eru tilreiddar skal tilreiða ríflega til að gera ráð fyrir hvers konar tapi sem getur átt sér stað þegar píplað er (dæmi: nota skal 25x fyrir einungis 24 efnahvörf).

Efnahvarf:

Aðalblanda	19,0 µl
Mót	1,0 µl
Samtals	20,0 µl

Lýsing lotuhitara:

1. þrep	94 °C	1 mín
2. þrep	94 °C	30 sek.
3. þrep	60 °C	30 sek.
4. þrep	72 °C	1 mín
5. þrep	Farið á 2. þrep	35 lotur
6. þrep	72 °C	1 mín
7. þrep	4 °C	stopp

Kjarnsýrumögnunarafurðir er hægt að keyra tafarlaust á geli eða geyma þær við 4 °C.

Rafdráttur á agarósageli (3%) (aðferðarlýsing fyrir sýni)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ísedik	5,71 ml
Na_2 (etýlendíamíntetraasetat)·$2H_2O$	3,72 g

Vatni er bætt í 100 ml

1X TAE

H2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agarósi

3 hlutar af NuSieve™ GTG™ agarósa

1 hluti af Fisher-agarósa með litlu rafgegnflæði (EEO)

Aðferð

1. Tilreiðið 3% gel með því að bæta 1,2 g af agarósablöndu í 43 ml af 1X TAE. Hringsnúið til að leysa upp stóra klumpa.

2. Setjið agarósablönduna í örbylgjuofn þangað til hún er alveg uppleyst (forðist að láta hana sjóða upp úr). Látið kólna lítillega.

3. Bætið við 1,0 µL af etidíumbrómíði (10 mg/ml). Hringsnúið flöskunni. Athygli er vakin á því að etidíumbrómíð er stökkbreytandi svo það skal nota staðgönguíðefni, að því marki sem það er tæknilega mögulegt, í þessu skrefi til að lágmarka heilbrigðisáhættu fyrir starfsfólk ([1]).

4. Hellið gelinu í mót með kambi (e. *mould with comb*). Kælið að fullu.

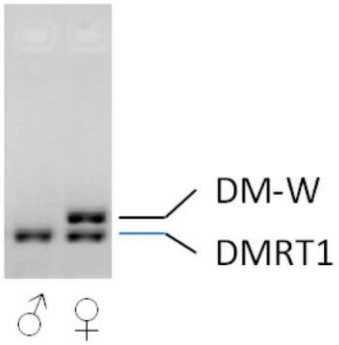
5. Bætið geli í búnaðinn. Þekið gelið með 1X TAE.

6. Bætið 1 µl af 6x hleðslulit í hver 10 µl af kjarnsýrumögnunarafurð.

7. Píplið sýnunum í holurnar.

8. Keyrið við stöðug 160 volt í ~20 mínútur.

   Agarósagelmynd sem sýnir bandamynstrin sem eru einkennandi fyrir karlkyns og kvenkyns einstaklinga er sýnd á **mynd 1**.



Mynd 1 Agarósagelmynd sem sýnir bandamynstrin sem eru einkennandi fyrir karlkyns (♂) einstakling (eitt band ~203 bp: DMRT1) og fyrir kvenkyns (♀) einstakling (tvö bönd við ~259 bp: DM-W og 203 bp:DMRT1).

HEIMILDIR

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in Xenopus laevis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

([1]) Í samræmi við 1. mgr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2004/37/EB frá 29. apríl 2004 um verndun starfsmanna gegn áhættu vegna áhrifa af krabbameinsvöldum eða stökkbreytivöldum á vinnustað (sjötta sértilskipun í skilningi 1. mgr. 16. gr. tilskipunar 89/391/EBE) (Stjtíð. ESB L 158, 30.4.2004, bls. 50).

6. viðbætir.

MÆLING Á VÍTELLÓGENÍNI

Mæling á vítellógeníni (VTG) er gerð með því að nota ELISA-prófunaraðferð sem var upphaflega þróuð fyrir vítellógenín í breiðkolli (Parks o.fl., 1999). Sem stendur eru engin mótefni fyrir *X. laevis*. fáanleg á almennum markaði. Miðað við allar þær upplýsingar sem til eru um þetta prótín og tiltækileika kostnaðarhagkvæmrar mótefnaframleiðslu á almennum markaði er þó raunhæft að rannsóknarstofur geti auðveldlega þróað ELISA-prófun til að gera þessar mælingar Olmstead o.fl., 2009). Olmstead o.fl. (2009) gáfu einnig lýsingu á greiningunni eins og hún var aðlöguð fyrir vítellógenín í X. tropicalis eins og sýnt er hér á eftir. Í aðferðinni er notað mótefni sem búið var til gegn vítellógeníni í *X. tropicalis* en vitað er að það virkar einnig fyrir vítellógenín úr *X. laevis*. Það skal bent á að einnig er hægt að nota ókeppnar (e. *non-competitive*) ELISA-prófanir og að greiningarmörk þeirra geta verið lægri en aðferðarinnar sem lýst er hér á eftir.

Efni og prófefni

— Forásogað (e. *preadsorbed*) sermi fyrir 1. mótefni

— Blandið einn hluta af anti- *X. tropicalis*-vítellógenínsermi fyrir 1. mótefni með 2 hlutum af blóðvökva frá samanburðarkarldýri og skiljið eftir við stofuhita í ~ 75 mínútur, setjið á ís í 30 mín, skiljið í skilvindu > 20K x G í 1 klst. við 4 °C, fjarlægið flotið, skiptið upp í deiliskammta og geymið við -20 °C.

— 2. mótefni

— Samsett geitar-IgG-HRP gegn kanínu (t.d. Bio-Rad 172-1019).

— Vítellógenínstaðallausn

— Hreinsað vítellógenín úr *X. laevis* við 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5‘ tetrametýlbensidín) (t.d., KPL 50-76-00; eða Sigma T0440)

— Eðlilegt geitasermi (NGS) (t.d., Chemicon® S26–100ml)

— 96 holu EIA míkrótítrunarbakkar úr pólýstýreni (e.g., ICN: 6-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 °C blöndunarhitaskápur (eða lofthitakassi sem nær jafnhita hratt) fyrir bakka, vatnsbað fyrir tilraunaglös

— Annar algengur búnaður fyrir rannsóknarstofur, íðefni og birgðir.

Uppskriftir

Jafni sem þekjuefni (50 mM karbónatjafnalausn, pH-gildi 9.6):

$NaHCO_3$	1,26 g
$Na2CO_3$	0,68 g
Vatn	428 ml

10X PBS (0.1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

NaH_2PO_4 H_2O	0,83 g
$Na_2HPO_4 \cdot 7$ H_2O	20,1 g
NaCl	71 g
Vatn	810 ml

Þvottajafnalausn (PBST):

10X PBS	100 ml
Vatn	900 ml

pH-gildið er stillt af við 7,3 með 1 M HCl, síðan er bætt við 0,5 ml af Tween-20

Greiningarjafnalausn

Eðlilegt geitasermi (NGS)	3,75 ml
Þvottajafnalausn	146,25 ml

Sýnataka

Blóð er tekið með heparínmeðhöndlaðri hárpípu og sett á ís. Eftir skiljun í 3 mínútur er gerð rispa í pípuna, hún brotin og blóðvökvanum hellt í 0,6 ml örskilvinduglös sem innihalda 0,13 einingar af frostþurrkuðu aprótíníni. (Þessi glös eru undirbúin fyrirfram með því að bæta í þau viðeigandi magni af aprótíníni, frysta þau og frostþurrka í hraðþjappa með lofttæmi (e. *speed-vac*) við lágan hita þar til þau eru þurr.) Blóðvökvi er geymdur við -80 °C fram að greiningu.

Verkferli fyrir einn bakka

Þekjuefni borið á bakkann

Blandið 20 µl af hreinsuðu vítellógeníni með 22 ml af karbónatjafnalausn (lokaniðurstaða 3 µg/ml). Bætið 200 µl í hverja holu í 96 holu bakka. Þekið bakkann með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 2 klst. (eða 4 °C yfir nótt).

Blokkun bakkans

Blokklausn er tilreidd með því að bæta 2 ml af eðlilegu geitasermi (NGS) í 38 ml af karbónatjafnalausn. Fjarlægið þekjuefnislausnina og hristið þar til hann er þurr. Bætið 350 µl af blokklausninni í hverja holu. Þekið með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 2 klst. (eða 4 °C yfir nótt).

Tilreiðsla staðallausna

Blandið 5.8 µl af hreinsaðri vítellógenínstaðallausn með 1,5 ml af greiningarjafnalausn í 12 x 75 mm einnota tilraunaglasi úr bórsílíkatgleri. Þetta gefur 12 760 ng/ml. Síðan er raðþynning framkvæmd með því að bæta 750 µl af fyrri þynningu í 750 µl af greiningarjafnalausn til að gefa lokastyrk sem nemur 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 og 50 ng/ml.

Undirbúningur sýna

Byrjið með 1:300 (blandið t.d. 1 µl af blóðvökva með 299 µl af greiningarjafnalausn) eða 1:30 þynningu á blóðvökva í greiningarjafnalausn. Ef reiknað er með miklu magni af vítellógeníni er e.t.v. þörf á fleiri eða meiri þynningum. Reynið að halda B/B_o innan styrkbila staðallausnanna. Að því er varðar sýni án merkjanlegs vítellógeníns, t.d. samanburðarkarldýr og -kvendýr (sem eru öll óþroskuð), skal nota 1:30 þynningu. Sýni sem eru þynnt minna en þetta geta sýnt óæskileg áhrif frá efniviði.

Að auki er mælt með því að keyra jákvætt samanburðarsýni á hverjum bakka. Það kemur úr samsettu blóðvökvasýni sem inniheldur há framkölluð vítellógeníngildi. Samsetta sýnið er upphaflega þynnt í eðlilegu geitasermi (NGS), skipt upp í deiliskammta og geymt við -80 C. Að því er varðar hvern bakka er deiliskammtur afþíddur, þynntur enn frekar í greiningarjafnalausn og meðhöndlaður á svipaðan hátt og prófunarsýni.

Viðstaða við tiltekin skilyrði með 1. mótefni

1. mótefni er tilreitt með því að útbúa 1:2000 þynningu á forásoguðu sermi fyrir 1. mótefni í greiningarjafnalausn (t.d. 8 µl í 16 ml af greiningarjafnalausn). Blandið 300 µl af 1. mótefnalausn saman við 300 µl af sýni/staðallausn í tilraunaglasi. B_o-tilraunaglasið er undirbúið á svipaðan hátt með 300 µl af greiningarjafnalausn og 300 µl af mótefni. Einnig skal undirbúa NSB-tilraunaglas og nota einungis 600 µl af greiningarjafnalausn, þ.e. ekkert mótefni. Þekið tilraunaglösin með parafilmu og hringsnúið þeim varlega til blöndunar. Látið standa í vatnsbaði við 37 °C í 1. klst.

Bakkinn þveginn

Þvoið bakkann rétt áður en viðstaðan með 1. mótefni er búin. Þetta er gert með því að hrista innihaldið úr og þerra hann með ídrægum pappír. Fyllið síðan holurnar með 350 µl af skolvökva, hellið úr og þerrið. Hér kemur margföld rafpípetta (e. *multi-channel repeater pipette*) eða bakkaþvottavél að góðum notum. Þvottaþrepið er endurtekið tvisvar í viðbót, samtals þrír þvottar.

Bakkinn fylltur

Fjarlægið tilraunaglösin úr vatnsbaðinu eftir að bakkinn hefur verið þveginn og hringsnúið þeim létt. Bætið 200 µl úr hverju sýni, staðallausn, B_o og NSB-tilraunaglasinu í tvær holur hverju í bakkanum. Þekið bakkann með sjálflímandi þéttifilmu og látið standa við 37 °C í 1 klst.

Viðstaða við tiltekin skilyrði með 2. mótefni

Þegar viðstöðunni í fyrra þrepi lýkur skal þvo bakkann aftur þrisvar sinnum, eins og hér að framan. Þynnta 2. mótefnið er tilreitt með því að blanda 2,5 µl af 2. mótefninu með 50 m. af greiningarjafnalausn. Bætið 200 µl af þynntu 2. mótefni í hverja holu, lokið eins og hér að framan og látið standa við 37 °C í 1 klst.

Undirstöðuefni bætt við

Þvoið bakkann þrisvar sinnum eins og lýst er hér að framan eftir að viðstöðunni með 2. mótefni er lokið. Bætið síðan 100 µl af TMB-undirstöðuefni í hverja holu. Leyfið efnahvarfinu að halda áfram í 10 mínútur, helst ekki í skæru ljósi. Stöðvið efnahvarfið með því að bæta við 100 µl af 1 M fosfórsýru. Þetta breytir litnum úr bláum í sterkgulan. Mælið gleypnina við 450 nm og notið bakkalesara.

Reiknið út B/B_o

Dragið meðaltal NSB-gildisins frá öllum mælingunum. B/B_o fyrir hvert sýni og staðallausnina er reiknað út með því að deila í gleypnigildið (B) með meðaltalsgleypni B_o-sýnisins.

Staðalferill fenginn og óþekkt magn ákvarðað

Búið til staðalferil með aðstoð tölvugrafíkhugbúnaðar (t.d. SlidewriteTM eða Sigma Plot®) sem framreiknar magnið úr B/B_o-gildi sýnisins á grundvelli B/B_o-gilda staðallausnanna. Alla jafna er magnið teiknað upp á lograkvarða og ferillinn er S-laga. Þó getur hann orðið línulegur þegar styrkbil staðallausnanna er þröngt. Leiðréttið sýnamagnið m.t.t. þynningarstuðulsins og gerið grein fyrir því sem mg af vítellógeníni/ml af blóðvökva.

Ákvörðun á lægstu greiningarmörkum

Það er oft ekki ljóst, einkum hjá eðlilegum karldýrum, hvernig á að greina frá niðurstöðum með lágum gildum. Í þeim tilvikum skal nota 95% öryggismörk til að ákvarða hvort gefa skuli gildið upp sem núll eða sem einhverja aðra tölu. Ef niðurstöður úr sýni eru innan öryggisbilsins fyrir núllstaðalinn (B_o) skal gefa niðurstöðuna upp sem núll. Lægsti staðallinn sem er stöðugt frábrugðinn núllstaðlinum er hafður sem lágmarksgreiningargildið; þ.e. öryggisbilin tvö skarast ekki. Gefa á upp útreiknaða gildið fyrir sérhverja niðurstöðu úr sýni sem er innan öryggismarka fyrir lágmarksgreiningargildið eða ofan við það. Ef sýni fellur á milli núllstaðalsins og öryggisbilanna fyrir lágmarksgreiningargildið skal gefa upp helminginn af lágmarksgreiningargildinu sem gildi þess sýnis.

HEIMILDIR

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: Xenopus tropicalis. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

7. viðbætir.

TÖLFRÆÐILEG GREINING

Rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) myndar þrenns konar gögn til tölfræðilegrar greiningar. 1) magnbundin samfelld gögn, 2) lifunargögn fyrir þroskunarhraða (tími til 62. NF-stigs) og 3) raðgögn í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga frá vefjafræðilegu mati. Ákvarðanatökutréð fyrir tölfræðilega greiningu sem mælt er með fyrir rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er sýnt á mynd 1. Nokkrar skýringar við texta sem kann að vera þörf á til að framkvæma tölfræðilega greiningu á mælingunum úr rannsókninni á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) koma einnig fram hér á eftir. Að því er varðar ákvarðanatökutréð fyrir greininguna skal greina niðurstöður úr mælingum á dánartölu, vexti (þyngd og lengd) og lifrar-/líkamsstuðul (LSI) samkvæmt greininni „aðrir endapunktar“.

Samfelld gögn

Gögn fyrir samfellda endapunkta skal athuga fyrst m.t.t. einhalla með því að röðunarvarpa gögnunum, setja þau upp í dreifnigreiningarlíkan og bera saman línulegt og annars stigs samanburðarfall. Ef gögnin eru einhalla skal framkvæma Jonckheere-Terpstra-leitnipróf með stiglækkun á miðgildi samhliða prófunar og ekki skal beita neinum síðari greiningum. Fyrir gögn sem eru normaldreifð með einsleitri dreifni er annar kostur að nota Williams-próf með stiglækkun. Ef gögnin eru ekki einhalla (annars stigs samanburðarfall er marktækt og línulegt ómarktækt) skal greina þau með því að nota dreifnigreiningarlíkan fyrir blönduð áhrif. Síðan skulu gögnin metin m.t.t. normleika (helst með því að nota Shapiro-Wilk- eða Anderson-Darling-próf) og einsleitni dreifni (helst með því að nota Levene-próf). Bæði prófin eru framkvæmd á leifum úr dreifnigreiningunni fyrir blönduð áhrif. Hægt er að nota sérfræðiálit í stað þessara formlegu prófa á normleika og einsleitni dreifni en formleg próf eru æskileg. Ef gögnin eru normaldreifð með einsleitri dreifni eru forsendur dreifnigreiningarlíkans fyrir blönduð áhrif uppfylltar og marktæk áhrif meðferðar eru ákveðin með Dunnett-prófi. Ef ónormleiki eða misleitni dreifni kemur í ljós eru forsendur Dunnett-prófs ekki uppfylltar og leitast er við að ná vörpun með dreifnistöðgun. Ef engin slík vörpun finnst eru marktæk áhrif meðferðar ákveðin með Dunn-prófi. Alltaf þegar unnt er skal framkvæma einhliða próf en ekki tvíhliða próf en það þarf sérfræðiálit að ákvarða hvað á við fyrir tiltekinn endapunkt.

Dánartölur

Greina skal gögn um dánartölur af öllu tímabilinu sem prófunin stóð yfir og þau skulu gefin upp sem dánarhlutfall í tilteknum tanki. Halakörtur sem ljúka ekki myndbreytingu innan tiltekins tímaramma, þær halakörtur sem eru í undirsýninu úr halakörtualdurshópnum, ungfroskar sem er fargað og öll dýr sem drepast vegna mistaka rannsakandans skulu meðhöndluð sem stýfð gögn og ekki tekin með í nefnarann við útreikning á hundraðshlutfallinu. Áður en nokkrar tölfræðilegar greiningar eru gerðar skal dánarhlutföllum arcsin-sqrt-umbreytt. Annar kostur er að nota Cochran-Armitage-próf með stiglækkun, hugsanlega með Rao-Scott-aðlögun ef dreifing er of mikil.

Þyngd og lengd (gögn um vöxt)

Kynbundin tvíbreytni er ekki fyrir hendi hjá karl- og kvendýrum meðan myndbreyting stendur yfir þannig að gögn um vöxt úr undirsýnum úr lirfum skulu greind óháð kyni. Þó skal greina gögn um vöxt ungviðis sérstaklega á grundvelli erfðafræðilegs kyns. Það kann að þurfa að log-varpa þessum endapunktum þar eð stærðargögn geta verið log-normleg.

Lifrar-/líkamsstuðull (LSI)

Þyngd lifrar skal stöðluð sem hlutfall af allri líkamsþyngdinni (þ.e. lifrar-/líkamsstuðull (LSI)) og greind sérstaklega á grundvelli erfðafræðilegs kyns.

Tími til 62. NF-stigs

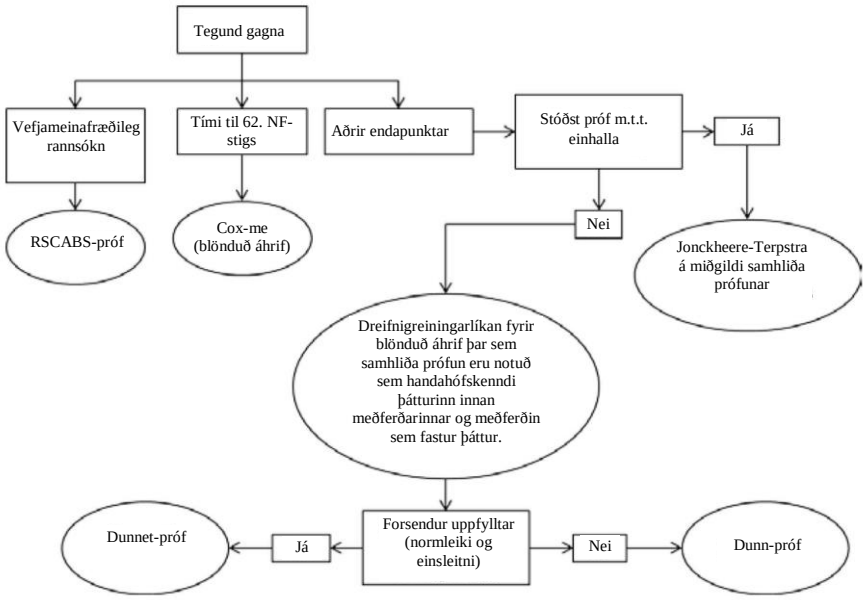
Gögn um tíma að myndbreytingu skulu meðhöndluð sem lifunargögn þar sem öll dauðsföll eða einstaklingar sem ná ekki 62. NF-stigi á 70 dögum eru meðhöndluð sem hægristýfð gögn (e. *right-censored data*) (þ.e. sanngildið er yfir 70 dagar en rannsóknin endar eftir 70 daga áður en dýrin hafa náð 62. NF-stigi). Miðgildistíminn til loka myndbreytingar á 62. NF-stigi í samanburðarprófun með þynningarvatni skal notaður til að ákvarða dagsetningu prófunarloka. Miðgildistímann þar til myndbreytingu er lokið er hægt að ákvarða með Kaplan-Meier-mati (e. *Kaplan-Meier product-limit estimator*). Þennan endapunkt skal greina með því að nota líkan Cox fyrir hlutfallslega áhættu (e. Cox *proportional hazard model*) með blönduðum áhrifum þar sem tekið er tillit til samhliða uppbyggingar rannsóknarinnar.

Vefjameinafræðileg gögn (alvarleikastigafjöldi og þroskunarstig)

Vefjameinafræðileg gögn eru í formi alvarleikastigafjölda eða þroskunarstiga. Í prófi sem nefnt er RSCABS-próf (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) er notuð Rao-Scotts-aðlögun með stiglækkun á Cochran-Armitage-leitniprófi fyrir hvert alvarleikastig í vefjameinafræðilegu svöruninni (Green o.fl., 2014). Í Rao-Scott-aðlöguninni felst tilraunahönnun sem fellir samhliða kerið inn í prófunina. Verkferlið „by Slices“ (í sneiðum) felur í sér þá líffræðilegu væntingu að alvarleiki áhrifa hafi tilhneigingu til að aukast með auknum skömmtum eða styrk en viðheldur um leið stigum hvers viðfangsefnis og leiðir í ljóst alvarleika hvers konar áhrifa sem finnast. Verkferli RSCABS-prófsins ákvarðar ekki einungis hvaða meðferðir eru tölfræðilega frábrugðnar samanburðinum (þ.e. þar sem sjúklegt ástand er alvarlegra en í samanburðinum) heldur ákvarðar það einnig við hvaða alvarleikastig mismunurinn á sér stað og skapar þar með þarft samhengi fyrir greininguna. Ef um er að ræða að ákvarða þroskunarstig kynkirtla og kynrása skulu gögnin meðhöndluð enn frekar vegna þess að forsenda RSCABS-prófs er að alvarleiki áhrifa aukist með skammtinum. Áhrifin sem koma fram geta verið seinkuð eða hröðuð þroskun. Þess vegna skal greina gögn um þroskunarstigsákvörðun eins og þau eru skráð til að koma auga á hraðaða þroskun og síðan umsnúa þeim handvirkt fyrir aðra greiningu til að koma auga á seinkaða þroskun.

Mynd 1

Ákvarðanatökutré fyrir tölfræðilega greiningu fyrir rannsókn á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA)



HEIMILDIR

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

8. viðbætir.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA ÞEGAR FYLGST ER HRYGGSKEKKJU OG HÚN LÁGMÖRKUÐ

Sjálfvakin hryggskekkja, sem kemur yfirleitt í ljós sem „boginn hali“ á halakörtum af tegundinni *Xenopus laevis*, getur flækt formfræðilegar og atferlistengdar athuganir á prófunarþýðum. Reynt skal að lágmarka eða útrýma tíðni hryggskekkju, bæði í stofni og við prófunarskilyrði. Í endanlegri prófun er mælt með því að algengi hryggskekkju í meðallagi og alvarlegrar hryggskekkju sé undir 10% til að auka tiltrú á því að prófunin geti greint meðferðartengd áhrif á þroskun hjá froskdýralirfum sem eru heilbrigðar að öðru leyti.

Við daglegar athuganir meðan endanleg prófun stendur yfir skal bæði skrá tíðni (einstaklingstalning) og alvarleika hryggskekkju þegar hún er til staðar. Afbrigðileikanum skal lýst að því er varðar staðsetningu (t.d. framan eða aftan við þarfagang) og í hvaða átt sveigjan er (t.d. hliðlæg eða frá baki að kviði). Alvarleika má flokka sem hér segir:

(EÁ) ekki áberandi: engin sveigja til staðar

1) Hverfandi: lítil sveigja á aftari hluta hliðlægt að þarfagangi; sést einungis í hvíld

2) Í meðallagi: sveigja á aftari hluta hliðlægt að þarfagangi; sést alltaf en hindrar ekki hreyfingu

3) Alvarleg: hliðlæg sveigja framan við þarfagang; EÐA hvers konar sveigja sem torveldar hreyfingu; EÐA hvers konar sveigja frá baki að kviði

Vísindaleg ráðgjafanefnd Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (FIFRA SAP 2013) fór yfir samantektargögn um hryggskekkju úr 15 greiningum á myndbreytingu hjá froskdýrum með *X. laevis* (51. NF-stig til 60+ NF-stigs) og veitti almennar ráðleggingar til að draga úr algengi þessa afbrigðileika í prófunarþýðum. Ráðleggingarnar skipta máli fyrir rannsóknina á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) jafnvel þótt þessi rannsókn nái yfir lengri þroskunartímalínu.

Rannsóknarsöguleg frammistaða við got

Almennt skal nota heilbrigð fullorðin dýr af miklum gæðum sem undaneldispör; ef fjarlægð eru undaneldispör sem eignast afkvæmi með hryggskekkju gæti það lágmarkað til lengri tíma að hún komi fyrir. Einkum getur verið gagnlegt að lágmarka notkun á veiddum, villtum undaneldisstofnum. Váhrifatímabil rannsóknar á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) hefst með fósturvísum á 8.–10. NF-stigi og það er ekki gerlegt að ákvarða við upphaf prófunar hvort tilteknir einstaklingar verði með hryggskekkju. Til viðbótar við að fylgjast með tíðni hryggskekkju hjá dýrum sem eru sett í prófun skal því skrá rannsóknarsögulegan árangur klakhópa (þ.m.t. tíðni hryggskekkju í öllum lirfum sem fá að þroskast). Það getur verið gagnlegt að vakta enn frekar hvaða hluti hvers klakhóps er ekki notaður í tiltekinni rannsókn og gera grein fyrir þessum athugunum (FIFRA SAP 2013).

Vatnsgæði

Það er mikilvægt að tryggja fullnægjandi vatnsgæði, bæði hjá stofni á rannsóknarstofu og meðan prófunin stendur yfir. Til viðbótar við viðmiðanir fyrir vatnsgæði sem eru metnar reglubundið í eiturhrifaprófunum í vatni getur verið gagnlegt að vakta og leiðrétta hvers konar næringarskort (t.d. skort á C-vítamíni, kalsíumi, fosfór) eða umframgildi selens og kopars sem greint hefur verið frá að valdi hryggskekkju að mismiklu marki hjá dýrum af tegundunum *Rana* sp. og *Xenopus* sp. sem eru alin á rannsóknarstofum (Marshall o.fl. 1980; Leibovitz o.fl. 1992; Martinez o.fl. 1992; eins og greint er frá í FIFRA SAP 2013). Notkun á viðeigandi mataræði (sjá 4. viðbæti) og regluleg hreinsun á tönkum mun að jafnaði almennt bæta vatnsgæði og heilbrigði prófunarsýnanna.

Fóður

Sérstök ráðgjöf um mataræði sem hefur reynst vel í rannsóknum á vexti og þroska froskdýralirfa (LAGDA) er skýrð nánar í 4. viðbæti. Mælt er með því að fóðurgjafar séu skimaðir fyrir líffræðilegum eiturefnum, illgresiseyðum og öðrum varnarefnum sem vitað er að valda hryggskekkju í *X. laevis* eða öðrum lagardýrum (Schlenk og Jenkins 2013). Til dæmis hafa váhrif frá tilteknum kólínesterasahömlum verið tengd við hryggskekkju í fiski (Schultz o.fl. 1985) og froskum (Bacchetta o.fl. 2008).

HEIMILDIR

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in Xenopus laevis embryos. Science of the Total Environment 392: 110–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (Rana catesbeiana) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (Rana catesbeiana) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared Rana perezi tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.“