

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 96/54/EB

2001/EES/51/33

frá 30. júlí 1996

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

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna ⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með tilskipun ráðsins 94/69/EB ⁽²⁾, einkum 28. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

Í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er skrá yfir hættuleg efni, flokkun þeirra og merkingu og, þar sem við á, lýsing á eiginleikum þeirra sem byggist á styrkmörkum og öðrum færíbreytum sem gera kleift að meta hve hættuleg þau eru fyrir heilsu manna og umhverfið. Í ljósi nýjustu vísinda- og tækniþekkingar er nauðsynlegt að aðlaga skrána yfir hættuleg efni í I. viðauka. Þess vegna er nauðsynlegt að breyta inngangsorðum I. viðauka þannig að þau nái yfir athugasemdir er varða merkingu á efnablöndum og nýjan flokk lífrænna efna í töflu B. Í skránni yfir hættuleg efni í I. viðauka eru efni sem Austurríki og Svíþjóð hafa fengið sérstakar bráðabirgðaundanþágur fyrir, að því er varðar flokkun og merkingu, með aðildarlögunum fyrir Austurríki, Finnland og Svíþjóð. Í aðildarlögunum er kveðið á um að kröfur um flokkun og merkingu þessara efna verði endurskoðaðar. Flokkun sumra þessara efna hefur því verið endurskoðuð.

Í III. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er skrá yfir setningar sem gefa til kynna eðli þeirrar sérstöku áhættu sem tengist hættulegum efnum og efnablöndum. Nauðsynlegt er að setja inn setningu sem gefur til kynna hættuna sem stafar af tilteknum efnum og efnablöndum við ásvelgingu.

(*) Þessi EB-gerð, sem birtist í Stjtið. EB L 248, 30.9.1996, bls. 1, var nefnd í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 106/2000 frá 30. nóvember 2000 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn. Sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópubandalagananna nr. 8, 15.2.2001, bls. 7.

⁽¹⁾ Stjtið. EB nr. L 196 frá 16. 8. 1967, bls. 1.

⁽²⁾ Stjtið. EB nr. L 381 frá 31. 12. 1994, bls. 1.

Í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er mælt fyrir um aðferðir við ákvörðun á eðlisefnafræðilegum eiginleikum, eiturhrifum og umhverfiseiturhrifum efna og efnablöndna. Nauðsynlegt er að aðlaga þann viðauka að tækniframförum.

Í VI. viðauka við tilskipun 67/548/EBE eru almennar viðmiðanir sem varða flokkun og merkingu hættulegra efna og efnablöndna. Setja þarf viðmiðanir um efni og efnablöndur sem eru hættulegar heilsunni við ásvelgingu. Breyta þarf viðmiðunum um ofnæmisvaldandi efni og efnablöndur.

Setja þarf viðmiðanir um merkingar gashylkja fyrir própan, bútan eða fljótandi jarðolíugas (LPG).

Ákvæði tilskipunar þessarar eru í samræmi við álit nefndar sem sér um að aðlaga, í samræmi við tækniframfarir, tilskipanir um að ryðja úr vegi tæknilegum hindrunum á viðskiptum með hættuleg efni og efnablöndur.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

I. gr.

Tilskipun 67/548/EBE er breytt sem hér segir:

1. I. viðauka er breytt sem hér segir:

- a) Í stað 4. athugasemdar í inngangsorðunum kemur eftirfarandi texti:

„4. athugasemd

Efnablöndur, sem innihalda þessi efni, verður að flokka sem hættulegar heilsu með H65 ef þær samrýmast viðmiðunum í lið 3.2.3. í VI. viðauka.“;

- b) Eftirfarandi er bætt við sem 5. athugasemd:
 „5. athugasemd
 Styrkmörk fyrir loftkenndar efnablöndur eru gefin upp sem rúmmálshlutfall.“;
- c) Eftirfarandi sérflokkun fyrir lífræn efni er bætt við töflu B í inngangsorðum I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE:
 „647 Enzimas
 Enzymer
 Enzyme
 Ένζυμα
 Enzymes
 Enzymes
 Enzimi
 Enzymen
 Enzimas
 Entsyymit
 Enzymer“;
- d) færslurnar í I. viðauka við þessa tilskipun koma í stað samsvarandi færslna;
- e) færslurnar í II. viðauka við þessa tilskipun eru settar í hann í fyrsta sinn;
- f) færslum með eftirfarandi númerum er eytt:
 008-002-00-3
 612-045-00-9
 648-011-00-5
 648-025-00-1
 648-157-00-X
 648-158-00-5
 648-159-00-0
 649-192-00-3;
- g) færslunum í III. viðauka við þessa tilskipun er breytt þannig að allar tilvísanir í H22 verða nú H65.
2. Eftirfarandi setning bætist við III. viðauka:
 „H65
 ES: Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.
 DA: Farlig: kan give lungeskade ved indtagelse.
 DE: Gesundheitsschädlich: kann beim Verschlucken Lungenschaden verursachen.
 EL: Επιδλαδές μπορεί να προκαλέσει δλάδη στους πνεύμονες σε περίπτωση κατάποσης.
 EN: Harmful: may cause lung damage if swallowed.
 FR: Nocif: peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion.
 IT: Nocivo: può causare danni ai polmoni in caso di ingestione.
- NL: Schadelijk: kan longschade veroorzaken na verslikken.
 PT: Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido.
 FI: Haitallista: voi aiheuttaa keuhkovaurion nieltäessä.
 SV: Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.
 IS: Hættulegt heilsu: getur valdið lungnaskaða við inntöku.“
3. B-hluta V. viðauka er breytt sem hér segir:
- a) textinn í IV. viðauka A við þessa tilskipun kemur í stað fyrirsagnar og almenns inngangs í B-hluta: Aðferðir við ákvörðun á eiturhrifum;
- b) textanum í IV. viðauka B við þessa tilskipun er skotið inn á eftir kafla B.1 bis;
- c) textinn í IV. viðauka C við þessa tilskipun kemur í stað kafla B.6;
- d) textinn í IV. viðauka D við þessa tilskipun kemur í stað kafla B.7;
- e) textanum í IV. viðauka E við þessa tilskipun er bætt við í lok viðaukans.
4. Texta VI. viðauka er breytt á þann hátt sem er tilgreint í V. viðauka við þessa tilskipun.
2. gr.
1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórn-sýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 31. maí 1998, samanber þó 2. málsgrein. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.
2. Eigi síðar en 31. október 1997 skulu aðildarríkin samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að F-, I- og J-hluta V. viðauka við þessa tilskipun. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.
3. Þegar aðildarríkin samþykkja ákvæðin, sem um getur í 1. og 2. mgr., skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þau verða birt opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.
3. gr.
- Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 30. júlí 1996.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Ritt BJERREGAARD

framkvæmdastjóri.

I., II. og III. viðauki við þessa tilskipun eru birtir í heild sinni í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna* nr. L 248, 30. 9. 96, bls. 5-188.

IV. VIÐAUKA

„B-HLUTI: AÐFERÐIR VIÐ AÐ ÁKVARÐA EITURHRIF OG ÖNNUR ÁHRIF Á HEILSU

ALMENNUR INNGANGUR: B-HLUTI

A. SKÝRINGAR

Í almennum inngangi er eftirfarandi tölusetning notuð:

- B.15. Genastökkbreyting — *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16. Endurröðun í mítósu — *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17. Genastökkbreytiprófun á spendýrafrumum í glasi
- B.18. DNA-skaði og -viðgerð — ófyrirséð DNA-nýmyndun — spendýrafrumur í glasi
- B.19. Víxlunarprófun systurlitningsþráða í glasi
- B.20. Kynbundin víkjandi banaprófun — *Drosophila melanogaster*
- B.21. Ummyndunarprófun á spendýrafrumum í glasi
- B.22. Ríkjandi banaprófun á nagdýrum
- B.23. Frumuerfðafræði kynfrumna spendýra í lífi
- B.24. Blettaprófun á músum
- B.25. Arfgeng litningayfirfærsla í músum
- B.26. Rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við inntöku: nagdýr fá endurtekinn skammt með inntöku í 90 daga
- B.27. Rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við inntöku: önnur dýr en nagdýr fá endurtekinn skammt með inntöku í 90 daga
- B.28. Rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við upptöku í gegnum húð: nagdýr fá endurtekinn skammt á húð í 90 daga
- B.29. Rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við innöndun: nagdýr fá endurtekinn skammt með innöndun í 90 daga
- B.30. Rannsókn á langvinnum eiturhrifum
- B.31. Vansköpunarprófun — nagdýr og önnur dýr
- B.32. Prófun á krabbameinsvirkni
- B.33. Sameinuð prófun á langvinnum eiturhrifum/krabbameinsvirkni
- B.34. Rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun í einni kynslóð
- B.35. Rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun í tveimur kynslóðum
- B.36. Rannsóknir á eiturefnaferlum

B. ALMENNAR SKILGREININGAR Á HUGTÖKUM SEM ERU NOTUÐ Í PRÓFUNARAÐFERÐUNUM Í ÞESSUM VIÐAUKA

- i) **Bráð eiturhrif** eru skaðleg áhrif sem koma fram innan ákveðins tíma (venjulega 14 daga) eftir að einn skammtur efnis hefur verið gefinn.
- ii) **Augljós eiturhrif** er almennt hugtak til að lýsa greinilegum merkjum um eiturhrif í kjölfar þess að prófunarefni er gefið. Þessi merki þurfa að vera nægilega mikil til að ástæða sé til hættumats og þess eðlis að stærri skammtur myndi að líkindum valda því að merki um alvarlega eitrun kæmu fram og hugsanlega leiða til dauða.
- iii) **Skammtur** er það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd (grömm eða milligrömm) eða sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (milligrömm á hvert kíló líkamspýngdar) eða sem fastur styrkur í föðri (milljónarhlutar eða milligrömm á hvert kílógramm föðurs).
- iv) **Greiniskammtur** er stærsti skammtur af fjórum föstum skömmtum sem hægt er að gefa án þess að efnið valdi dauða (að meðtaldri aflifun af mannúðarástæðum).

- v) **Skömmtun** er almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu þétt hann er gefinn og hve lengi.
- vi) **LD₅₀** (miðgildisbanaskammtur) er einn tölfraðilega reiknaður skammtur efnis sem búast má við að valdi dauða 50% tilraunadýranna. LD₅₀-gildi er sett fram sem þyngd prófunarefnis á þyngdareiningu tilraunadýrs (milligrömm á kílógramm).
- vii) **LC₅₀** (miðgildisbanastyrkur) er tölfraðilega reiknaður styrkur efnis sem búast má við að valdi dauða, á meðan váhrif vara eða innan ákveðins tíma eftir að þeim lýkur, hjá 50% þeirra dýra sem verða fyrir váhrifum frá efninu í tiltekinn tíma.
- LC₅₀-gildið** er sett fram sem þyngd prófunarefnis á staðalrúmmál lofts (milligrömm á lítra).
- viii) **NOAEL** er skammstöfun á „no observed adverse effect level“ (skammtur án merkjanlegra, skaðlegra áhrifa) og er stærsti skammtur eða mestu váhrif án þess að meðferðin valdi merkjanlegum skaðlegum áhrifum.
- ix) **Endurtekinn skammtur/hálflangvinn eiturrif** eru skaðleg áhrif sem koma í ljós hjá tilraunadýrum eftir endurtekna, daglega skammta af, eða váhrif frá, ákveðnu efni í stuttan tíma af áætluðum líftíma dýranna.
- x) **Hámarksþolsskammtur (MTD)** er stærsti skammtur sem framkallar merki um eiturrif í dýrum, án þess að hafa veruleg áhrif á lifun í prófuninni þar sem hann er notaður.
- xi) **Húðerting** er myndun bólgubreytinga sem koma fram í húð eftir að prófunarefni hefur verið borið á hana.
- xii) **Augnerting** er myndun breytinga í auga eftir að prófunarefni hefur verið borið í það.
- xiii) **Húðnæming** (exem vegna snertiofnæmis) er ónæmisbundin svörun í húð við prófunarefni.
- xiv) **Húðæting** er óafturkallanleg vefjaskemmd í húð eftir að prófunarefni hefur verið á henni á bilinu frá þremur mínútum og upp í 4 klukkustundir.
- xv) **Rannsóknir** á eiturfnaferlum merkir rannsóknir á upptöku, dreifingu, efnaskiptum og útskilnaði prófunarefna.
- xvi) **Uptaka** merkir það hvernig prófunarefni berst inn í líkamann.
- xvii) **Útskilnaður** merkir það hvernig prófunarefni og/eða umbrotsefni þess skiljast út úr líkamanum.
- xviii) **Dreifing** merkir það hvernig efni sem tekið er upp og/eða umbrotsefni þess deilist innan líkamans.
- xix) **Efnaskipti** merkja það hvernig bygging prófunarefna breytist í líkamanum við efnahvörf, með eða án ensíma.

B.1 Bráð eiturrif — endurteknir skammtar / háflangvinn og langvinn eiturrif

Hægt er að meta bráð eiturrif og eiturrif á lífveru eða einstök líffæri með ýmsum eiturrifaprófunum (aðferðir B.1-B.5), en með þeim er hægt að fá fram fyrstu vísbendingu um eiturrif, eftir einn skammt.

Komið getur til álita að gera markprófun í stað fullrar LD₅₀-prófunar, eftir því hve mikil eiturrif efnisins eru; markprófun er þó ekki tilgreind í innöndunarrannsóknum vegna þess að ekki hefur reynt gerlegt að skilgreina eitt markgildi fyrir váhrif við innöndun.

Helst ber að velja aðferðir þar sem notuð eru eins fá dýr og mögulegt er og reynt að láta þau þjást sem minnst, til dæmis aðferð með föstum skammti (aðferð B.1 bis) og aðferð til flokkunar sem bráð eiturrif (aðferð B.1 ter). Í prófunum á 1. stigi getur rannsókn á annarri tegund stutt ályktanir sem eru dregnar af fyrstu rannsókninni. Í því tilvikum er hægt að nota staðlaða prófunaraðferð eða breyta henni þannig að færri dýr séu notuð.

Eiturhrifaprófun með endurteknum skömmtum (aðferðir B.7, B.8 og B.9) felur í sér mat á eiturhrifum við endurtekin váhrif. Lögð er áhersla á vandlega klíniska athugun á dýrunum til að afla eins mikilla upplýsinga og unnt er. Þessar prófanir ættu að gera það auðveldara að sanngreina marklíffæri eiturhrifa og eittraða og óeittraða skammta. Enn fremur getur þurft að gera frekari nákvæmar langtímarannsóknir á þessum sviðum (aðferðir B.26 - B.30 og B.33).

B.II Stökkbreytirkni — Erfðaeiturhrif

Með stökkbreytirkni er átt við myndun varanlegra breytinga sem geta gengið að erfðum og verða á magni eða byggingu erfðaefnis frumna eða lífvera. Þessar breytingar, eða „stökkbreytingar“, geta náð til eins gens eða genasamstæðu, genaflokks eða heilla litninga. Áhrif á heila litninga geta komið fram í breytingu á byggingu þeirra og/eða fjölda.

Stökkbreytirkni efnis er athuguð með rannsókn í glasi á gena(punkt)stökkbreytingum í bakteríum (aðferð B.13/14) og/eða rannsókn á frávikum í byggingu litninga í frumum spendýra (aðferð B.10).

Einnig má nota aðferðir í lífi, til dæmis smákjarnaprófunina (aðferð B.12) eða metafagasgreiningu á beinmergsfrumum (aðferð B.11). Þó er sterklega mælt með aðferðum í tilraunaglassi ef engar frábendingar finnast.

Þegar um mikið magn er að ræða, og/eða þegar framkvæma þarf áhættumat eða fylgja því eftir, getur verið þörf á viðbótarathugunum til að rannsaka nánar stökkbreytirkni eða forskima eftir krabbameinsvirkni og þær má nota í margvíslegum tilgangi: til að staðfesta niðurstöður sem hafa fengist í grunnrannsóknnum, athuga lokastig (end-points) sem voru ekki rannsökuð í grunnrannsóknnum og til að hefja eða útvíkka rannsóknir í lífi.

Þess vegna ná aðferðir B.15 til B.25 bæði yfir heilkjarnakerfi í lífi og í glasi og yfir vítt svið líffræðilegra lokastiga. Þessar prófanir veita upplýsingar um punktbreytingar og önnur lokastig í lífverum sem eru flóknari en bakteríurnar sem notaðar eru í grunnrannsókninni.

Almennt gildir að þegar gerð er áætlun um frekari rannsóknir á stökkbreytingum skal skipuleggja hana með það fyrir augum að fá aukna vitneskju um stökkbreyti- og/eða krabbamyndunargetu þess efnis sem um ræðir.

Það hvaða rannsóknir eiga við í hverju tilviki um sig ræðst af mörgum þáttum, þar á meðal efna- og eðliseiginleikum efnisins, niðurstöðum úr bakteríu- og frumufræðilegum frumathugunum, áhrifum efnisins á efnaskipti, niðurstöðum annarra eiturhrifarannsóknna og þekktri notkun efnisins. Þess vegna er ekki rétt að fara eftir ósveigjanlegri áætlun þegar prófunaraðferð er valin, í ljósi þeirra breytilegu þátta sem taka þarf tillit til.

Mælt er fyrir um nokkrar almennar meginreglur um prófanaáætlanir í tilskipun 93/67/EBE, en skýra stefnu varðandi prófanir er að finna í tæknilega leiðbeiningaritinu um áhættumat, sem engu að síður er sveigjanlegt og má laga að sérstökum aðstæðum eftir því sem við á.

Hér á eftir eru aðferðir við frekari rannsóknir flokkaðar, eftir helstu erfðafraðilegum lokastigum:

Rannsóknir á gena(punkt)breytingum.

- Rannsóknir á stökkbreytingum eða víxluðum stökkbreytingum með notkun heilkjarnaörvera (*Saccharomyces cerevisiae*) (aðferð B.15).
- Rannsóknir á stökkbreytingum í spendýrafrumum í glasi (aðferð B.17).
- Kynbundin víkjandi banaprófun á *Drosophila melanogaster* (aðferð B.20).
- Rannsókn í lífi á stökkbreytingu í líkamsfrumum; blettaprófun á músum, (aðferð B.24).

Rannsóknir á litningabrenslum

- Frumufræðilegar rannsóknir í spendýrum í lífi; hugleiða ætti greiningu í lífi á beinmergsfrumum í metafasa ef hún hefur ekki verið með í frummatinu (aðferð B.11). Auk þess kemur til álita að rannsaka frumufræðilega kynfrumna í lífi (aðferð B.23).
- Frumufræðilegar rannsóknir á spendýrafrumum í glasi, ef þær hafa ekki verið með í frummatinu (aðferð B.10).
- Ríkjandi banaprófun á nagdýrum (aðferð B.22).
- Prófun á arfgengri litningayfirfærslu í músum (aðferð B.25).

Erfðaeiturfræðileg áhrif — áhrif á DNA

Erfðaeiturhrif, sem eru skilgreind sem hugsanleg skaðleg áhrif á erfðaeefni, þó ekki endilega í tengslum við stökkbreytivræði, geta komið fram þannig að þau valda skaða á DNA, án beinna vísbendinga um stökkbreytingu. Eftirfarandi aðferðir, þar sem notaðar eru heilkjarnaörverur eða spendýrafrumur, geta hentað vel til slíkra rannsókna:

- a) Endurröðun í mítósu í *Saccharomyces cerevisiae* (aðferð B.16).
- b) DNA-skaði og -viðgerð — ófyrirséð DNA-nýmyndun — spendýrafrumur í glasi (aðferð B.18).
- c) Vöxlunarprófun systurlitningsþráða í spendýrafrumum í glasi (aðferð B.19)

Aðrar aðferðir við að rannsaka krabbamyndunargetu

Til eru aðferðir til að prófa ummyndun í spendýrafrumum þar sem mæld er geta efnis til að framkalla formbreytingar og hegðunarbreytingar í frumurækt, sem álitid er að tengist illkynja ummyndunum — í lífi (aðferð B.21). Nota má nokkrar mismunandi frumutegundir og ummyndunarviðmiðanir.

Áhættumat fyrir arfgengi í spendýrum

Til eru aðferðir til að mæla arfgengi breytinga í heilum spendýrum, sem eru framkallaðar með gena(punkt)stökkbreytingum, til dæmis með sérstakri gensætprófun í músum, til að mæla stökkbreytingu kímfrumna í fyrsta ættlið (ekki tekið með í þessum viðauka) eða litningabrengr, til dæmis prófun á arfgengri yfirfærslu í músum (aðferð B.25). Slíkar aðferðir má nota við mat á hugsanlegri erfðafræðilegri áhættu sem mönnum er búin vegna tiltekens efnis. Í ljósi þess hve flóknar þessar prófanir eru og þess mikla fjölda dýra sem þarf að nota, einkum við sérstöku gensætprófunina, þurfa að vera gild rök fyrir því að gera slíkar athuganir.

B.III Krabbameinsvirkni

Lýsa má efnunum sem erfðaeiturfræðilegum eða ekki erfðaeiturfræðilegum krabbameinsvöldum, eftir þeim verkunum sem búist er við að þau hafi.

Með rannsóknum á stökkbreytivræði/erfðaeiturhrifum geta fengist bráðabirgðaupplýsingar um erfðaeiturfræðilega krabbamyndunargetu efnis. Frekari upplýsingar má fá með prófunum á eiturhrifum eftir endurtekna skammta eða á hálflangvinnnum eða langvinnnum eiturhrifum. Í eiturhrifaprófuninni með endurteknum skömmtum, aðferð B.7, og lengri rannsóknum með endurteknum skömmtum er fólgið mat á vefjameinafræðilegum breytingum sem geta skipt máli og koma fram í eiturhrifaprófunum með endurteknum skömmtum, til dæmis vefjaauki frumna í tilteknum vefjum. Þessar rannsóknir og upplýsingar um eiturefnaferli geta auðveldað sanngreiningu efna með krabbameinsvaldandi eiginleika og hugsanlega gefið tilefni til nánari rannsóknar á þessum þætti með prófun á krabbameinsvirkni (aðferð B.32) og iðulega með sameinaðri prófun á langvinnnum eiturhrifum/krabbameinsvirkni (aðferð B.33).

B.IV Skaðleg áhrif á æxlun

Greina má skaðleg áhrif á æxlun á fleiri en einn hátt, til dæmis má sjá þau á því að dregur úr starfsemi æxlunarfæra eða æxlunargetu kven- og karldýrs, skilgreint sem „áhrif á frjósemi“, eða á óarfngengum, skaðlegum áhrifum á afkvæmin, skilgreint sem „þroskaeiturhrif“, þar með talin vansköpun og áhrif á mjólkurskeiði.

Þegar vansköpun er rannsökuð, sem hluti af prófunum á þroskaeiturhrifum, miðast prófunaraðferðin (aðferð B.31) fyrst og fremst við inngjöf um munn. Til greina kemur að nota aðrar inngjafarleiðir en það ræðst af eðliseiginleikum prófunarefnisins eða af því eftir hvaða leiðum menn getu orðið fyrir váhrifum frá efninu. Í slíkum tilvikum skal breyta prófunaraðferðinni með tilliti til viðeigandi þátta í 28 daga prófunaraðferðunum.

Þegar krafist er þriggja kynslóða prófunar á æxlun (frjósemi) er hægt að vikka út aðferðina, sem er lýst fyrir tveggja kynslóða æxlunarprófunina (aðferð B.35), svo að hún nái yfir þriðju kynslóðina.

B.V Taugaeiturhrif

Taugaeiturhrif má greina á ýmsan hátt, til dæmis á starfrænum breytingum og/eða formbreytingum og lífefnafræðilegum breytingum í miðtaugakerfi eða úttaugakerfi. Prófanir á bráðum eiturhrifum geta gefið bráðabirgðavísendingar um taugaeiturhrif. Innifalið í eiturhrifaprófun með endurteknum skömmtum (aðferð B.7) er mat á taugaeiturhrifum og lögð er áhersla á þörfina á nákvæmum klínískum athugunum á dýrunum til að fá eins miklar upplýsingar og hægt er. Aðferðina má nota til þess að sanngreina efni sem geta valdið taugaeiturhrifum, en það getur gefið tilefni til ítarlegra viðbótarrannsókna. Auk þess er mikilvægt að huga að getu efna til að valda sértækum taugaeiturhrifum, sem ekki hafa komið fram í öðrum eiturhrifarannsóknum. Til dæmis eru til sérstök lífræn fosförsambönd sem komið hefur í ljós að valda töfðum taugaeiturhrifum, en þessi sambönd má kanna með aðferðum B.37 og B.38, eftir váhrif frá einum skammti eða endurteknum skömmtum.

B.VI Ónæmiseiturhrif

Ónæmiseiturhrif má greina á ýmsa vegu, til dæmis á ónæmisbælingu og/eða auknum viðbrögðum ónæmiskerfisins, sem veldur annaðhvort ofnæmi eða auknu sjálfsnæmi. Innfalið í eiturhrifaprófun með endurteknum skömmtum, aðferð B.7, er mat á ónæmiseiturhrifum. Aðferðina má nota til þess að sanngreina efni sem geta valdið ónæmiseiturhrifum, en það getur gefið tilefni til ítarlegra viðbótarrannsókna.

B.VII Rannsóknir á eiturefnaferlum

Rannsóknir á eiturefnaferlum auðvelda túlkun og mat á gögnum úr eiturhrifarannsóknum. Tilgangur þessara rannsókna er að varpa ljósi á einstök atriði eiturhrifa efnisins sem verið er að prófa og niðurstöðurnar geta gagnast við skipulagningu frekari eiturhrifarannsókna. Ekki þarf að ákvarða allar færíbreytur í hverju einstöku tilviki. Ekki er nauðsynlegt að framkvæma allar rannsóknirnar á eiturefnaferlum (upptaka, útskiljun, dreifing og efnaskipti) nema í fáum tilvikum. Fyrir tiltekin efnasambönd getur verið ráðlegt að breyta röð rannsóknanna og í sumum tilvikum er prófun með einum skammti nægileg (aðferð B.36).

Upplýsingar um byggingu efna (SAR) og eðlisefnafræðilega eiginleika geta einnig gefið vísbendingu um það hvernig upptaka fer fram, þegar ákveðin leið við inngjöf efnis er valin, og um möguleika á efnaskiptum og dreifingu í vefjum. Einnig geta upplýsingar um færíbreytur eiturefnaferla legið fyrir úr fyrri rannsóknum á eiturhrifum og eiturefnaferlum.

C. LÝSING Á EIGINLEIKUM PRÓFUNAREFNIS

Samsetning prófunarefnis, þar á meðal helstu óhreinindi og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem máli skipta í þessu sambandi, að meðtöldum stöðugleika, skal vera þekkt áður en rannsókn á eiturhrifum er hafin.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnis veita mikilvægar upplýsingar sem nýtast við val á inngjafarleið, skipulagningu hvernar rannsóknar um sig og meðhöndlun og geymslu prófunarefnis.

Áður en rannsókn hefst skal þróa greiningaraðferð fyrir þáttbundna og magnbundna ákvörðun á prófunarefninu (þar með talin helstu óhreinindi þegar mögulegt er) í skömmtunarmiðlinum og í lífrænum efnunum.

Allar upplýsingar um sanngreiningu, eðlisefnafræðilega eiginleika, hreinleika og hegðun prófunarefnisins skulu vera í prófunarskýrslunni.

D. UMHIRÐA DÝRA

Við rannsóknir á eiturhrifum er nauðsynlegt að hafa strangt eftirlit með umhverfisaðstæðum og réttar aðferðir við umönnun dýra.

i) Umhverfi

Umhverfisaðstæður í tilraunaherbergjum eða búrum þurfa að vera við hæfi hvernar dýrategundar um sig. Hæfilegar aðstæður fyrir rottur, mýs og naggrisi eru við hitann $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ og rakann 30 til 70%; kanínur ætti að hafa við hitann $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ og rakann 30 til 70%.

Sumar tilraunaaðferðir eru sérstaklega næmar fyrir hitaáhrifum og í þeim tilvikum eru upplýsingar um hæfilegar aðstæður hafðar með í lýsingu á prófunaraðferðinni. Í öllum rannsóknum á eiturhrifum er hiti og raki athugaður, skráður og látinn fylgja lokaskýrslunni.

Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Upplýsingar um lýsingarmynstur skal skrá og taka þær með í lokaskýrslu um rannsóknina.

Ef ekki eru fyrirmæli um annað í aðferðinni má hafa dýrin í búrum eitt og eitt eða í litlum hópum af sama kyni; ekki má þó hafa fleiri en fimm dýr saman í búi.

Í skýrslum um tilraunir á dýrum er mikilvægt að tilgreina hvaða tegund búra er notuð og fjölda dýra í hverju búi, bæði á meðan váhrif frá efninu eiga sér stað og á athugunartímanum sem á eftir fer.

ii) Fóðrun

Fóðrið skal uppfylla allar næringarþarfir tegundarinnar sem verið er að prófa. Þegar dýrum eru gefin prófunarefni í fóðrinu getur dregið úr næringargildinu vegna víxlverkunar efnisins og einhverra fóðurþátta. Taka verður slíka virkni með í reikninginn þegar niðurstöður prófunar eru túlkaðar. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.

Aðskotaefni í fóðrinu, sem vitað er að hafa áhrif á eiturvirkni, mega ekki vera í svo miklu magni að það hafi áhrif á prófunina.

E. MEÐFERÐ DÝRA

Þegar prófunaraðferðir eru útfærðar er vandlega hugað að meðferð dýra. Nokkur dæmi eru tekin hér á eftir, en listinn er ekki tæmandi. Nákvæmt orðalag og/eda nákvæm skilyrði er að finna í lýsingu á aðferðunum:

- Þegar ákvarða skal bráð eiturrhif við inngjöf um munn ber að velja á milli tveggja eftirfarandi aðferða, „aðferðar með föstum skammti“ og „aðferðar til flokkunar sem bráð eiturrhif“. Í aðferð með föstum skammti er ekki sérstaklega stefnt að dauða dýrsins sem lokastigi og þar eru færri dýr notuð. Í aðferð til flokkunar sem bráð eiturrhif eru að jafnaði notuð 70% færri dýr en í aðferð B.1 fyrir bráð eiturrhif við inngjöf um munn. Báðum þessum aðferðum fylgir minni sársauki og þjáning en í hefðbundnum aðferðum.
- Dýrum er fækkað niður í lágmark sem er viðunandi frá vísindalegu sjónarmiði: aðeins 5 dýr af sama kyni eru prófuð með hverri skammtastærð í aðferðum B.1 og B.3; aðeins 10 dýr (og aðeins 5 í neikvæða samanburðarhópnum) eru notuð til að ákvarða húðnæmingu í hámrökunarprófun á naggrísnum (aðferð B.6); einnig er færri dýra þörf í jákvæða samanburðarhópnum þegar stökkbreytivræki er rannsökuð í lífi (aðferðir B.11 og B.12).
- Sársauka og þjáningu dýranna er haldið í lágmarki meðan á prófunum stendur: dýr sem sýna mikil og stöðug merki um sársauka og þjáningu getur þurft að aflífa á mannúðlegan hátt; ekki þarf að gefa prófunarefni með aðferð sem vitað er að veldur verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða ertandi eiginleika (aðferðir B.1, B.2 og B.3).
- Komist er hjá prófunum þar sem óþarflega stórir skammtar eru gefnir með því að taka upp markprófanir, ekki aðeins í prófunum á bráðum eiturrhifum (aðferðir B.1, B.2 og B.3) heldur einnig í stökkbreytivrækiprófunum í lífi (aðferðir B.11 og B.12).
- Áætlun um prófanir á ertingu gerir nú mögulegt að sleppa prófunum eða draga svo úr þeim að einungis sé eitt dýr rannsakað, þegar nægileg vísindaleg gögn eru fyrirleggjandi.

Slík vísindaleg gögn geta byggst á eðlisefnafræðilegum eiginleikum efnisins, niðurstöðum úr öðrum prófunum sem hafa verið gerðar áður eða niðurstöðum staðfesta prófana í glasi. Sem dæmi má nefna að ef gerð hefur verið prófun á bráðum eiturrhifum eftir upptöku gegnum húð með markprófunarskammti af efninu (aðferð B.3) og engin húðerting kemur fram kunna frekari prófanir á húðertingu (aðferð B.4) að vera óþarfleg; ef rannsókn á húðertingu leiðir í ljós að efni hafa valdið greinilegri ætingu eða alvarlegri húðertingu (aðferð B.4) ætti ekki að prófa þau með tilliti til augnertingar (aðferð B. 5).

F. AÐRAR PRÓFUNARAÐFERÐIR

Evrópusambandið hefur sett sér það vísindalega markmið að þróa og fullgilda aðra tækni þar sem jafn miklar upplýsingar fást og við núverandi prófanir á dýrum, en þar sem færri dýr eru notuð, dýrin þjást minna eða alveg er sneitt hjá nokun dýra.

Eftir því sem slíkar aðferðir eru þróaðar skal taka þær upp, eftir því sem hægt er, í tengslum við áhættulýsingu, og í framhaldi af því flokkun og merkingu efnanna með tilliti til hættunnar sem stafar af þeim.

G. MAT OG TÚLKUN

Þegar niðurstöður dýratilrauna og rannsókna í glasi eru metnar og túlkaðar, verður að taka tillit til þess að takmörk eru fyrir því að hve miklu leyti hægt að yfirfæra þær á menn og þess vegna er rétt að nota gögn um skaðleg áhrif á menn, þar sem þau liggja fyrir, til að staðfesta niðurstöður prófana.

Þær niðurstöður má nota þegar ný og gömul efni eru flokkuð og merkt með tilliti til áhrifa á heilsu fólks, á grundvelli eðliseiginleika sinna, eins og greint er og mælt með þessum aðferðum. Samsvarandi viðmiðanir í VI. viðauka um flokkun og merkingu tengjast einnig lokastigunum í aðferðarlýsingu fyrir þessar prófunaraðferðir.

Einnig má nota þessar niðurstöður til rannsókna vegna áhættumats fyrir ný og gömul efni og heppileg prófunaráætlun í því skyni er tilgreind í viðkomandi leiðbeiningaritum.

H. HEIMILDIR

Flestar af þessum aðferðum eru þróaðar innan ramma OECD-áætlunar um viðmiðunarreglur við prófanir og þær ber að framkvæma í samræmi við meginreglur um góðar starfsvenjur við rannsóknir til að tryggja „gagnkvæma samþykkt gagna“ eins vel og hægt er.

Viðbótarupplýsingar er að finna í tilvísunum í viðmiðunarreglur OECD og heimildum sem tengjast þeim en eru gefnar út annars staðar.“

IV. VIÐAUKI B

„B.1 ter BRÁÐ EITURHRIF (VIÐ INNGJÖF UM MUNN) — AÐFERÐ TIL FLOKKUNAR SEM BRÁÐ EITURHRIF

1. **AÐFERÐ**1.1. **Inngangur**

Innifaldar í aðferð til flokkunar sem bráð eiturrif eru upplýsingar, bæði um hættumat og um röðun í hættuflokka.

Í aðferðinni eru notaðir þrjú fastir skammtar, nægilega aðgreindir til að hægt sé að flokka efnin á grundvelli niðurstaðna rannsóknarinnar. Auk þess er gefinn möguleiki á því í þessari prófunaraðferð að velja þrjú fasta skammta til viðbótar, sem annaðhvort má velja um sem annan kost á tilteknu ákvörðunarstigi eða þegar gera á frekari prófanir. Nota má (einn eða fleiri) viðbótarskammta ef nákvæmari rannsókn er talin æskileg eða nauðsynleg.

Notaðir eru fastir upphafsskammtar og tilgangurinn með aðferðinni er ekki sá að reikna LD₅₀-gildið nákvæmlega, en hún veitir möguleika á að ákvarða umfang váhrifa þar sem vænta má að tilraunadýr láti lífið, þar eð dauði ákveðins hlutfalls dýranna er enn þýðingarmesta lokastig þessarar prófunar. Niðurstöður prófunarinnar ætti að vera hægt að nota til flokkunar samkvæmt viðmiðunum í VI. viðauka. Þar eð þessi aðferð er runubundin getur prófunin staðið lengur en lýst er í aðferð B.1. Helsti kosturinn við þessa aðferð er að notuð eru færri dýr en í prófun á bráðum eiturrifum við inngjöf um munn (B.1) og aðferðinni sem velja má um, aðferð með föstum skammti (B.1 bis).

Sjá einnig almennan inngang, B-hluta.

1.2. **Skilgreiningar**

Sjá almennan inngang, B-hluta.

1.3. **Meginregla prófunaraðferðarinnar**

Einn af föstum skömmtum efnisins er gefinn hópi tilraunadýra um munn. Efnid er prófað í þrepum og þrjú samkynja tilraunadýr notuð í hverju þrepi. Undirbúningsathugun á dýrunum er ekki nauðsynleg. Næsta þrep ræðst af því hvort efnisskammtur á tilteknu þrepi veldur dauða dýranna eða ekki, þ.e.a.s.:

- ekki er þörf á frekari rannsókn
- á næsta þrepi fær dýr af hinu kyninu sama skammt
- á næsta þrepi er gefin næsta skammtastærð fyrir ofan eða neðan.

1.4. **Lýsing á prófunaraðferðinni**1.4.1. *Undirbúningur*

Heilbrigð, ung og fullvaxin dýr eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í að minnsta kosti fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni. Hafa má nokkur dýr saman í búi eftir kyni og skammtastærð en ekki fleiri en svo að hægt sé að fylgjast vel með hverju dýri.

Dýrunum er gefið prófunarefnið í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu.

Þegar þess gerist þörf er prófunarefnið haft uppleyst eða sem sviðlausn í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota lausnir/sviðlausnir í vatni ef það er hægt, en að öðrum kosti lausnir/fleytilausnir í olíu (til dæmis máisólíu) og lausnir í öðrum burðarefnum geta einnig komið til greina. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eiturreiginleikar þeirra vera þekktir, en að öðrum kosti skal ákvarða þá fyrir prófunina.

Dýrin skulu vera fastandi fyrir inngjöf (rottur yfir nótt en mýs í 3-4 tíma); þau skulu fá nægju sína af vatni.

1.4.2. *Prófunaraðstæður*

1.4.2.1. Tilraunadýr

Rottur eru ákjósanlegustu tilraunadýrin nema vitað sé um frábendingar. Kvendýrin mega ekki hafa gotið og ekki vera kviðug.

Í upphafi tilraunarinnar skal þyngdarmunur dýranna vera í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.4.2.2. Fjöldi og kyn

Þrjú samkynja dýr eru notuð í hverju þrepi. Nota má hvort kynið sem er í fyrsta þrepi.

1.4.2.3. Skammtastærðir

Skammtastærðin í upphafi er valin úr þremur föstum stærðum, þ.e. 25, 200 og 2 000 mg á hvert kg líkamsþyngdar. Í upphafi skal nota þá skammtastærð sem er líklegust til að valda dauða að minnsta kosti sumra dýranna sem fá skammtinn. Nota má eitt af flæðiritunum sem lýst er í I. viðauka, eftir því hver upphafsskammturinn er.

Þegar velja skal kyn og upphafsskammt ber að nota allar tiltækar upplýsingar, þar á meðal upplýsingar um vensl efnabyggingar og virkni. Þegar ráða má af upplýsingunum að ólíklegt sé að stærsti skammtur (2 000 mg/kg líkamsþyngdar) valdi dauða, ber að gera markprófun. Ef engar upplýsingar eru til um prófunarefnið er mælt með því, af mannúðarástæðum, að nota upphafsskammtinn 200 mg á hvert kg líkamsþyngdar.

Stöku sinnum getur verið þörf á nákvæmari upplýsingum en hægt er að fá með prófuninni með þremur föstu skammtastærðunum, 25, 200 og 2 000 mg/kg líkamsþyngdar. Þegar svo ber undir er hugsanlegt að endurtaka prófunina með föstum viðbótarskömmtum af stærðinni 5, 50 eða 500 mg á hvert kg líkamsþyngdar.

Ekki þarf að gefa skammta sem vitað er að valda verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða mjög ertandi verkana.

Sá tími, sem líður á milli meðferðar hinna ýmsu hópa, ákvarðast af því hvenær merki um eiturrhif koma fram, hve lengi þau standa og hve alvarleg þau eru. Rétt er að bíða með meðferð dýra af hinu kyninu eða meðferð með næsta skammti þar til vissa er fyrir því að dýrin, sem áður fengu skammt, hafa lifað af.

1.4.2.4. Markprófun

Framkvæma má markprófun með einum skammti af stærðinni 2 000 mg/kg líkamsþyngdar á þremur dýrum af hvoru kyni. Ef efnið veldur dauða getur verið nauðsynlegt að endurtaka prófunina með 200 mg (eða 500 mg) á hvert kg líkamsþyngdar.

1.4.2.5. Athugunartímabil

Að jafnaði skal fylgjast með dýrunum í 14 daga, nema þeim sem deyja í prófuninni og þeim sem þarf að taka úr henni og aflífa af mannúðarástæðum. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveða með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og því má framlengja það þegar þess gerist þörf. Miklu skiptir hvenær merki um eiturrhif koma fram og hverfa, einkum þegar eitrunareinkennin koma seint í ljós. Skrá skal allar athuganir skipulega í sérstakri skýrslu fyrir hvert dýr.

1.4.3. *Verklag*

Eftir föstutímabilið skal vigta dýrin áður en þeim er gefið prófunarefni. Þegar prófunarefnið hefur verið gefið má láta dýrin fasta í 3-4 klukkustundir í viðbót. Þegar efnisskammti er skipt í marga hluta og hann gefinn inn á ákveðnu tímabili getur verið nauðsynlegt að gefa dýrunum föður og vatn, eftir því hve langt tímabilið er.

Af stærð prófunardýrsins ræðst hve mikinn vökva má gefa inn í einu. Þegar um nagdýr er að ræða skal magnið að jafnaði ekki fara yfir 1 ml/100 gr líkamsþyngdar; þó geta 2 ml/100 gr líkamsþyngdar komið til greina þegar um vatnslausnir er að ræða. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkinn þannig að rúmmál haldist jafnt hver sem skammturinn er. Ef ekki er hægt að gefa inn í einum skammti má gefa hann inn í smærri hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

Prófunaraðferðinni er lýst ítarlega í I. viðauka.

1.4.3.1. Almennar athuganir

Gera þarf nákvæmar, klínískar athuganir að minnsta kosti tvisvar daginn sem prófunarefnið er gefið inn, eða oftar ef viðbrögð dýranna við meðferðinni gefa tilefni til, og að minnsta kosti einu sinni á dag eftir það. Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu skal aflífa á mannúðlegan hátt. Farið er með dýr, sem eru aflífuð af mannúðarástæðum, á sama hátt og dýr sem deyja í prófun.

Þegar dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum eða komið að þeim dauðum, skal skrá dauðastund eins nákvæmlega og hægt er. Nauðsynlegt er að gera viðbótarathuganir ef dýrin halda áfram að sýna merki um eiturhrif. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálfta, krampa, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dáí.

Skrá skal allar athuganir skipulega í sérstakri skýrslu fyrir hvert dýr.

1.4.3.2. Líkamsþyngd

Öll dýr skal vigta stuttu áður en prófunarefnið er gefið og að minnsta kosti vikulega eftir það. Reikna skal út og skrá þyngdarbreytingar. Í lok prófunarinnar skal vigta dýrin sem eftir lifa áður en þau eru aflífuð á mannúðlegan hátt.

1.4.3.3. Stórsæ krufning

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

2. GÖGN

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

Í II. viðauka eru almennar leiðbeiningar um túlkun niðurstaðna með tilliti til flokkunar.

3. SKÝRSLUGERÐ

Prófunarskýrsla

Eftirtalдар upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

- tegund/stofn;
- örverufræðilegt ástand dýrsins, ef það er þekkt;
- fjöldi, aldur og kyn dýranna;
- uppruni, umhverfi á rannsóknarstofu, fóður o.s.frv.;
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, vikulega eftir það og við lok prófunar.

Prófunaraðstæður:

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn;
- nákvæmar upplýsingar um inngjöf prófunarefnisins, þar á meðal skammtastærðir og tíma inngjafar;
- nákvæmar upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þar á meðal tegund/uppruna, uppruna vatns);
- forsendur fyrir vali á upphafsskammti.

Niðurstöður:

- gögn í töfluformi yfir svörun eftir kyni og skammtastigi, fyrir hvert dýr (þ.e. dýr sem sýna merki um eiturhrif, þar á meðal dauða, eðli áhrifanna, hve slæm þau eru og hve lengi þau standa);
- hvenær merki um eiturhrif koma fram, hvernig framvindan er og hvort eiturhrifin ganga til baka, fyrir hvert dýr;
- niðurstöður krufningar og vefjameinafræðilegar niðurstöður fyrir hvert dýr, ef þær eru fyrir hendi.

*Umfjöllun um niðurstöður.**Ályktanir.*4. **HEIMILDIR**

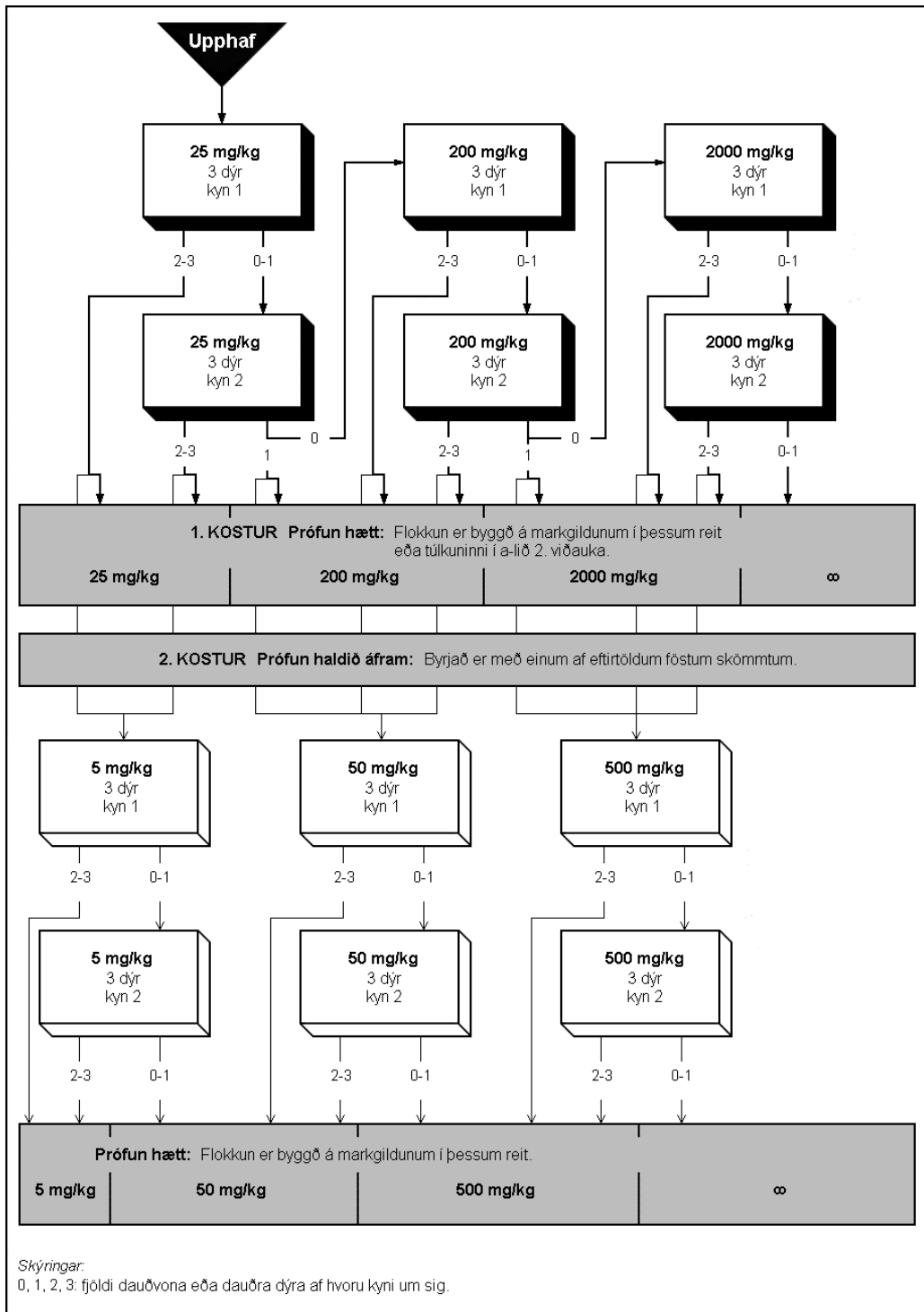
Þessi aðferð svarar til TG 423 frá OECD.

1. VIÐAUKI

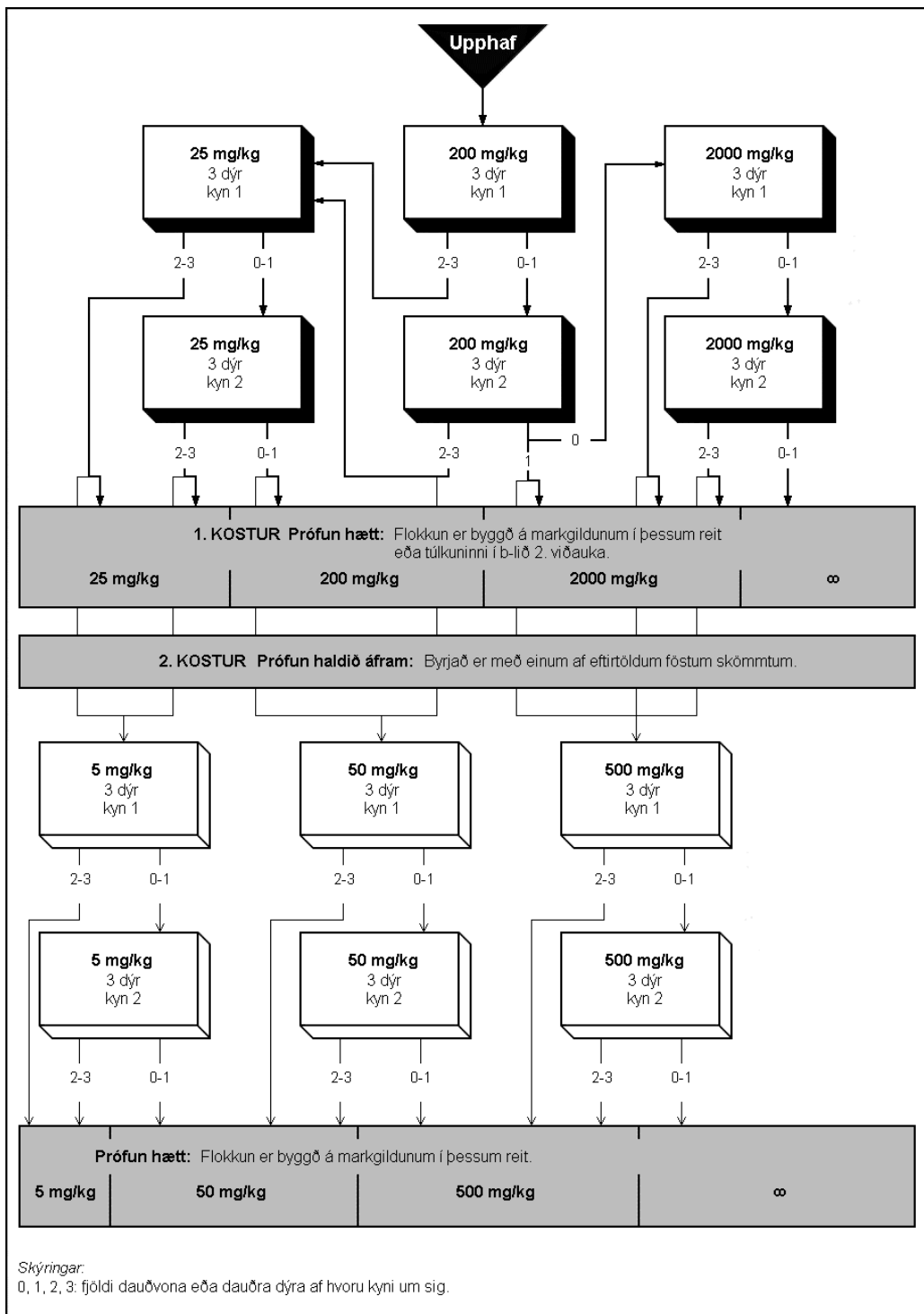
VERKLAG VIÐ PRÓFUN

1. Eins og getið er í lið 1.4.2.3 ber að velja upphafsskammt sem er líklegur til að valda dauða að minnsta kosti sumra af þeim dýrum sem fengu prófunarefnið. Upplýsingar, sem nota má við val á upphafsskammti, eru:
 - gögn um eðlisefnafræðilega eiginleika;
 - vensl efnabyggingar og virkni;
 - öll gögn úr öðrum prófunum á eiturhrifum; og
 - áætluð notkun prófunarefnisins.
2. Á viðkomandi skýringarmyndum í þessum viðauka er því verklagi lýst sem nota skal fyrir hvern upphafsskammt. Prófunarferlið er sýnt með örvunum og fer eftir því hve mörg dýr deyja eða eru aflífuð af mannúðarástæðum.
3. Þegar aðeins eitt dýr af síðara kyninu deyr af völdum upphafsskammtsins 25 eða 200 mg/kg líkamsþyngdar, er yfirleitt ekki haldið áfram með prófanir. Þegar engin merki um eitrun koma fram í hinum fimm dýrunum, skal þó hafa þann möguleika í huga við krufningu að prófunarefnið hafi ekki valdið dauða dýrsins. Í því tilviki skal halda prófuninni áfram og gefa inn skammt af prófunarefninu sem er einu stigi sterkari en sá síðasti.
4. Þegar eitt dýr af hvort kyni deyr eftir að hafa fengið skammtinn 2 000 mg/kg líkamsþyngdar er reiknað með því að gildi LD₅₀ sé hærra en 2 000 mg/kg líkamsþyngdar. Þar sem þetta er óviss niðurstaða skal þó athuga vandlega viðbrögð dýranna tveggja sem eftir eru af hvoru kyni og ef fram koma skýr og greinileg merki um eitrun í þessum dýrum getur það leitt til flokkunar sem svarar til LD₅₀-gildisins 2 000 mg/kg líkamsþyngdar eða minna eða gefið tilefni til frekari prófana á sama prófunarstigi.
5. Með þessu verklagi er gefinn möguleiki á prófun á þremur föstum skömmtum til viðbótar (2. kostur). Þennan kost má annaðhvort nota til að skipta um skammt á tilteknu ákvörðunarstigi eða til frekari prófana eftir að þessari prófun er lokið (1. kostur). Verklag við prófun, miðað við 1. kost, er merkt með feitletruðum örvum en verklag miðað við 2. kost er merkt með grönnum örvum.

a) Verklag við prófun með upphafsskammtinum 25 mg/kg líkamsþyngdar



b) Verklag við prófun með upphafsskammtinum 200 mg/kg líkamsþyngdar figure=9654-201.eps



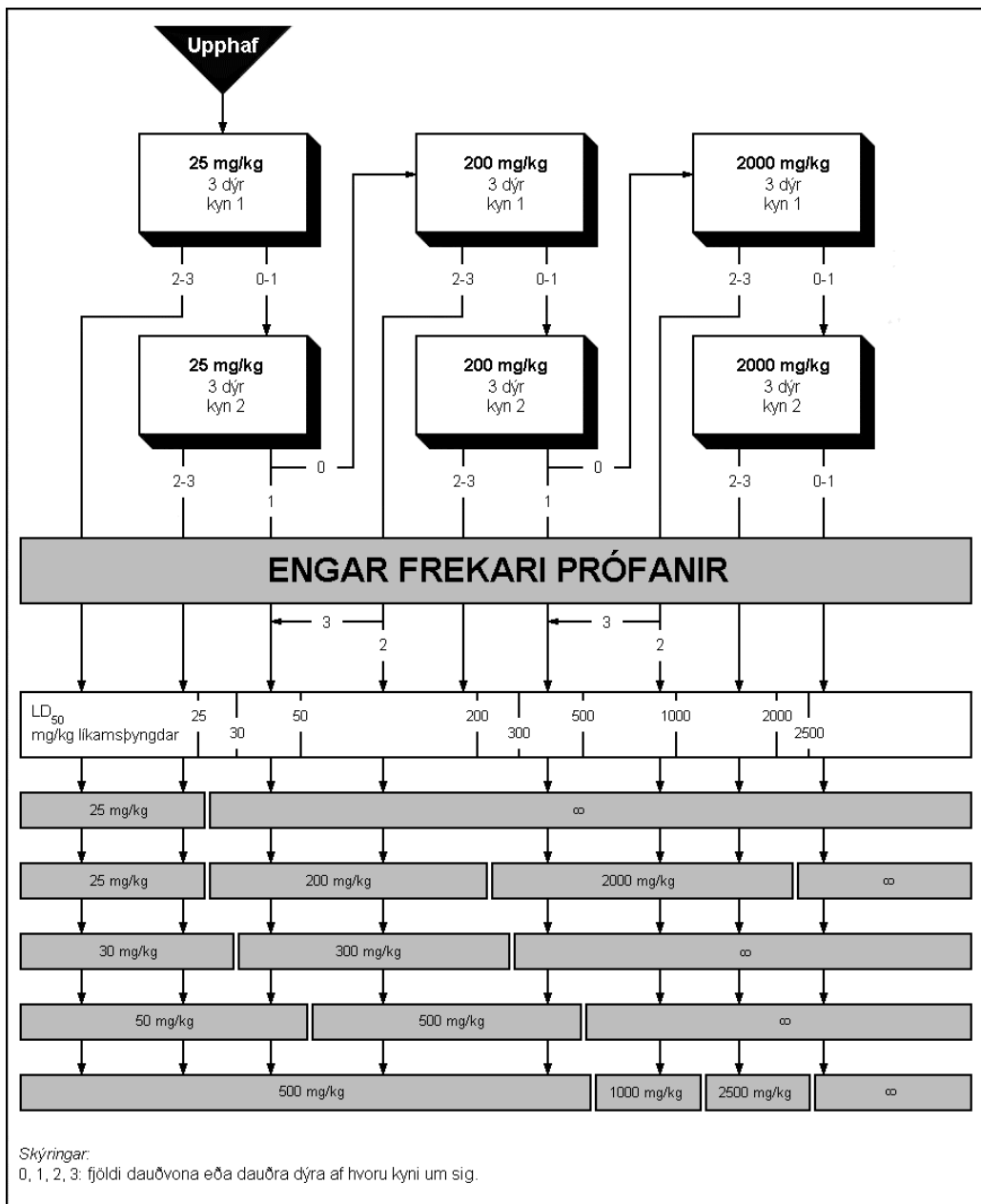
2. VIÐAUKI

TÚLKUN NIÐURSTAÐNA Á GRUNDFELLI PRÓFUNAR SAMKVÆMT 1. KOSTI

Í gráu reitunum fyrir neðan „engar frekari prófanir“ í skýringarmyndunum í þessum viðauka eru sýnd þau markgildi sem notuð eru við flokkun. Þegar verklag við prófun er samkvæmt 1. kosti er viðeigandi ör fylgt þar til komið er að þeim gráa reit sem við á.

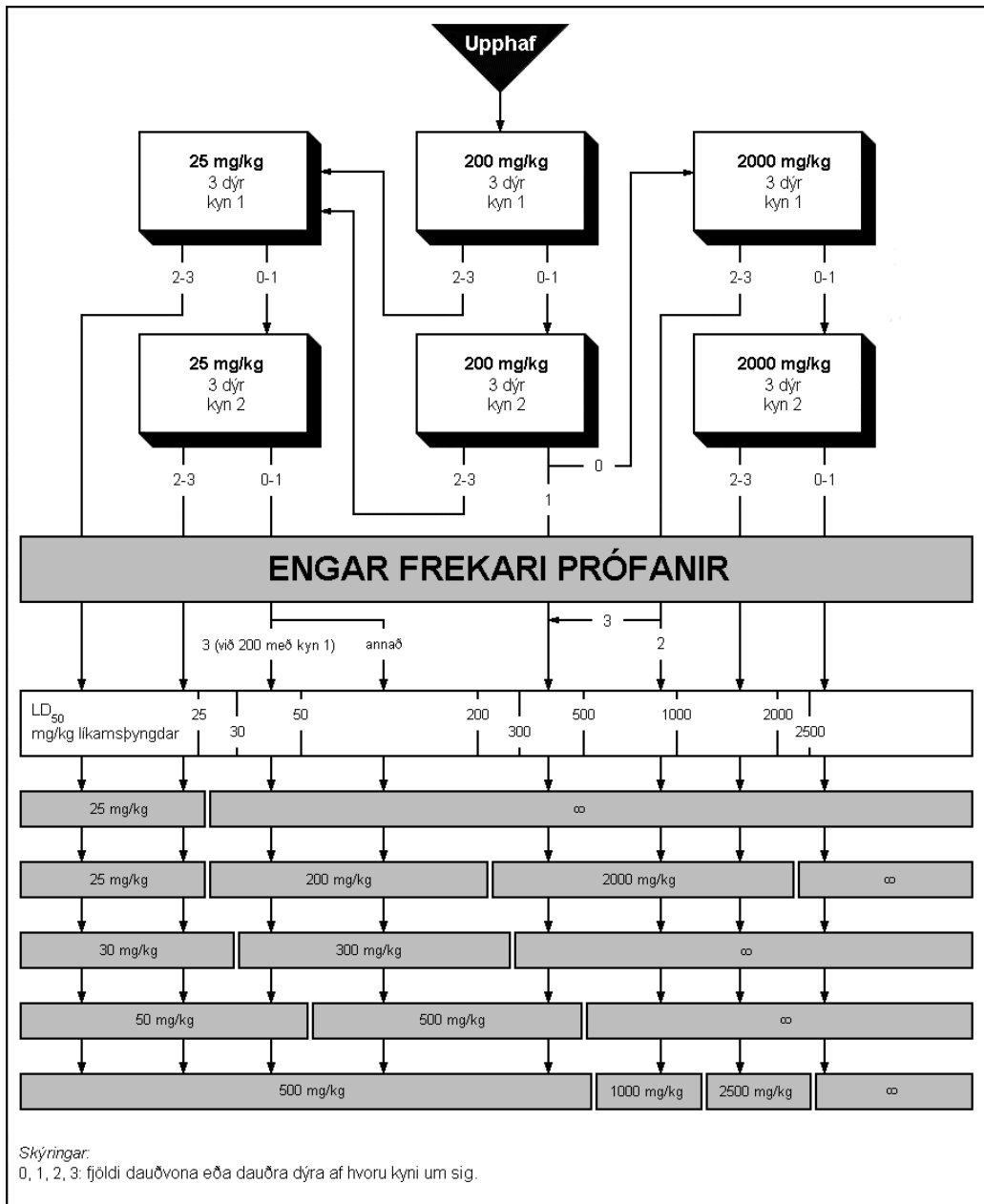
a) Túlkun niðurstaðna á grundvelli prófunar samkvæmt 1. kosti

Upphafsskammtur: 25 mg/kg líkamsþyngdar



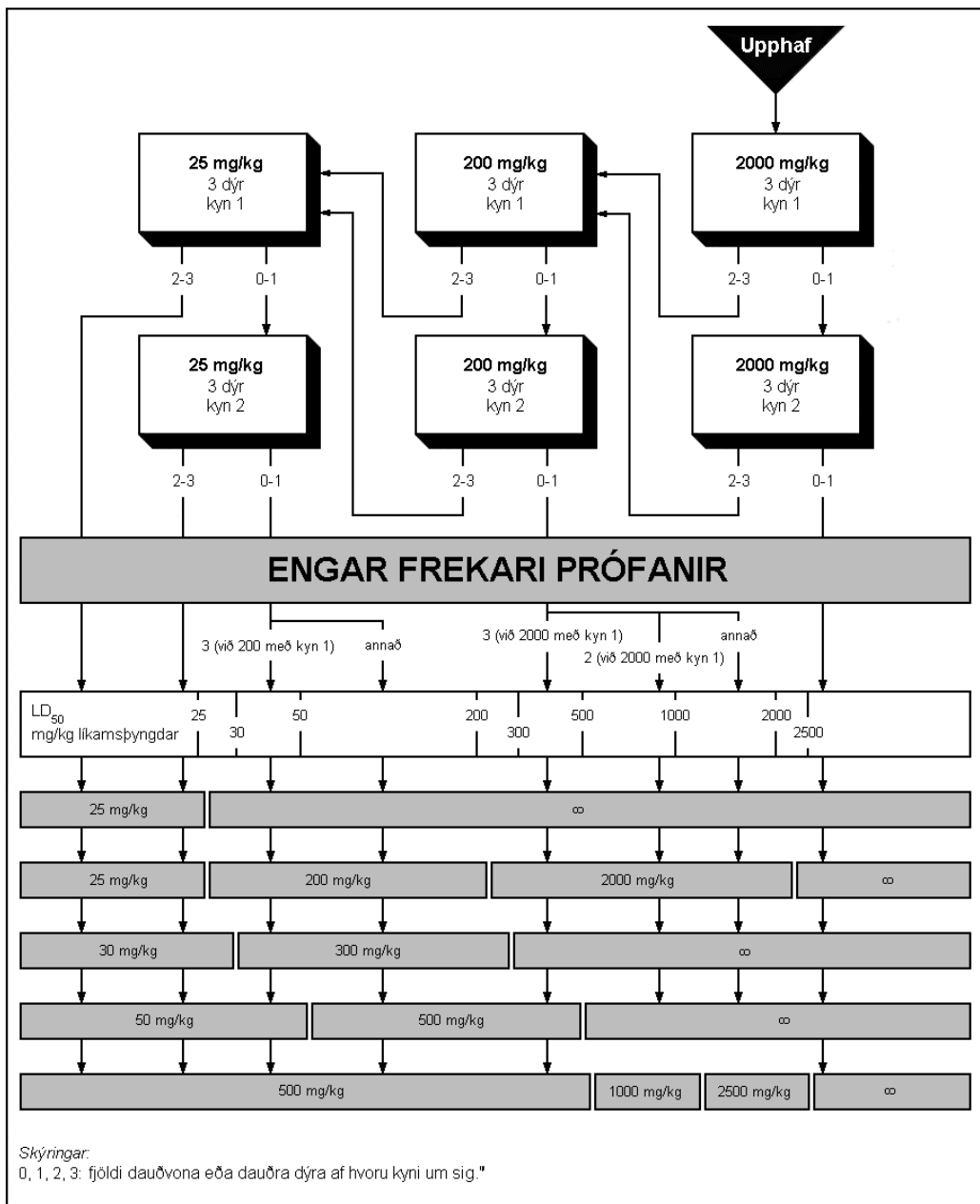
b) Túlkun niðurstaðna á grundvelli prófunar samkvæmt 1. kosti

Upphafsskammtur: 200 mg/kg líkamsþyngdar



c) Túlkun niðurstaðna á grundvelli prófunar samkvæmt 1. kosti

Upphafsskammtur: 2 000 mg/kg líkamsþyngdar



IV. VIÐAUKI C

„B.6 HÚÐNÆMING

1. **AÐFERÐ**1.1. **Inngangur**

Athugasemdir:

Í flokkunarkerfi fyrir eiturhrif sem varða almannaheilbrigði telst mikilvægt að til séu næmar prófunaraðferðir til að finna efni sem geta valdið húðnæmingu hjá mönnum.

Engin ein prófunaraðferð er til sem nota má til að sanngreina öll efni sem geta valdið húðnæmingu hjá mönnum og sem hentar á öll efni.

Þegar prófun er valin verður að taka tillit til þátta á borð við eðliseiginleika efna, meðal annars hæfni þeirra til að smjúga gegnum húð.

Þróaðar hafa verið tvær gerðir prófana þar sem naggrísir eru notaðir: prófun með ónæmisglæðum, en þar er ofnæmisástand magnað með því að útbúa lausn eða sviflausn af prófunarefninu í fullkomnum ónæmisglæði Friends (Freund's complete adjuvant FCA), og prófanir án ónæmisglæða.

Með ónæmisglæðaprófunum má að jafnaði segja fyrir um líkleg húðnæmandi áhrif efna hjá mönnum með nákvæmari hætti en með aðferðum þar sem fullkominn ónæmisglæði Friends er ekki notaður, og eru hinar fyrirtölu því æskilegri.

Hámörkunarprófun á naggrísum (GPMT) er algeng ónæmisglæðaprófun. Þó að nota megi nokkrar aðrar aðferðir til að greina hugsanleg húðnæmingaráhrif efna er GPMT talin ákjósanlegasta ónæmisglæðaáferðin.

Prófanir án ónæmisglæðis (sú ákjósanlegasta er Buehler-prófunin) teljast minna næmar á marga efnaflokka.

Í ákveðnum tilvikum getur verið gild ástæða til að velja Buehler-prófun, þar sem efnið er borið á staðbundið, fremur en að því sé sprautað í húð eins og í hámröknarprófun á naggrísum. Þegar Buehler-prófunin er notuð skal færa vísindaleg rök fyrir því.

Í þessari aðferð er gefin lýsing á hámröknarprófun á naggrísum (GPMT) og Buehler-prófun. Nota má aðrar aðferðir að því tilskildu að þær hafi verið vel staðfestar og að færð séu fyrir því vísindaleg rök.

Ef jákvæðar niðurstöður fást úr viðurkenndri skimunarprófun, er leyfilegt að merkja prófunarefnið sem hugsanlegan næmi og vera kann að ekki þurfi að gera frekari prófanir á naggrísum. Ef niðurstöður úr slíkri prófun eru hins vegar neikvæðar, skal framkvæma prófun á naggrísum og nota verklagið sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

Sjá einnig almennan inngang, B-hluta.

1.2. **Skilgreiningar**

Húðnæming: (exem vegna snertiofnæmis) er ónæmisbundin svörun í húð við efni. Í mönnum getur svörunin komið fram í kláða, hörundsroða, bjúg, nöbbum, bólum, blöðrum eða samblandi af þessu. Í öðrum tegundum getur svörunin verið önnur, til dæmis aðeins hörundsroði og bjúgur.

Örvunarváhrif: viðfang er í tilraunaskyni látið verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu með það fyrir augum að framkalla ofnæmi.

Örvunartímabil: tímabil þar sem ofnæmi getur komið fram og stendur að minnsta kosti í eina viku eftir örvunarváhrif.

Áreitnisváhrif: viðfang, sem hefur áður fengið skammt af prófunarefni, er í tilraunaskyni látið verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, að loknu örvunartímabili, til að ákvarða hvort ofnæmi kemur fram hjá viðfanginu.

1.3. Viðmiðunarefni

Meta skal næmleika og áreiðanleika tilraunatækninnar á sex mánaða fresti með því að nota efni sem vitað er að hafa væga eða hóflega húðnæmingareiginleika.

Í prófun sem rétt er staðið að má búast við að minnsta kosti 30% svörun í ónæmisglæðaprófun og að minnsta kosti 15% í prófun án ónæmisglæða þegar vægir/hóflegir næmar eru rannsakaðir.

Mælt er með eftirfarandi efnunum:

CAS númer	EINECS númer	EINECS heiti	Almennt heiti
101-86-0	202-983-3	α -hexýlsinnamaldehyð	α -hexýlsinnamaldehyð
149-30-4	205-736-8	bensóþíasól-2-þíól (merkaptó-bensóþíasól)	kaptax
94-07-7	202-303-5	bensókain	norkain

Við vissar aðstæður má nota önnur samanburðarefni, sem uppfylla áðurgreind skilyrði, þegar gild rök eru fyrir því.

1.4. Meginregla prófunaraðferðarinnar

Í upphafi eru tilraunadýrin látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefni sem sprautað er í húðina og/eða borið á hana (örvunarváhrif). Eftir 10 til 14 daga hvíldartíma (örvunartímabil), en þá getur þróast ónæmissvörun, er dýrunum gefinn áreitisskammtur. Umfang og styrkur húðviðbragða við áreitissváhrifum hjá prófunardýrunum er borið saman við það sem kemur fram hjá samanburðardýrum sem fá sýndarmeðferð á örvunartímabilinu og fá síðan áreitisskammt.

1.5. Lýsing á prófunaraðferðum

Ef nauðsynlegt er talið að fjarlægja prófunarefnið ber að nota til þess vatn eða hentuga lausn sem breytir ekki þeirri svörun sem hefur komið fram og skaðar ekki húðþekjuna.

1.5.1. Hámarksprófun á naggrísunum (GPMT)

1.5.1.1. Undirbúningur

Heilbrigðir, ungir, en fullvaxnir naggrísahvítingjar eru látnir aðlagast aðstæðum á tilraunastofnunni í að minnsta kosti 5 daga áður en prófun hefst. Fyrir prófunina er dýrunum skipt af handahófi í tilraunahópa. Hár er klippt eða nakað af eða hugsanlega fjarlægt með háreyðingarefni, eftir því hvaða prófunaraðferð er notuð. Gæta verður þess að erta ekki húðina. Dýrin eru vigtuð áður en prófunin hefst og þegar henni lýkur.

1.5.1.2. Prófunaraðstæður

1.5.1.2.1. Tilraunadýr

Notaðir eru naggrísahvítingjar af algengum rannsóknarstofustofni.

1.5.1.2.2. Fjöldi og kyn

Nota má kvendýr og/eða karldýr. Ef kvendýr eru notuð mega þau ekki hafa gotið og ekki vera kviðug.

Nota skal minnst 10 dýr í tilraunahópnum og að minnsta kosti 5 dýr í samanburðarhópnum. Þegar notaðir eru færri en 20 tilraunaggrísir og 10 samanburðarnaggrísir og ekki fæst úr því skorið hvort prófunarefnið sé næmir, er eindregið mælt með því að prófa efnið á fleiri dýrum þannig að tilraunadýrin verði að minnsta kosti 20 samtals og samanburðardýrin 10.

1.5.1.2.3. Skammtastærðir

Sá styrkur prófunarefnisins, sem notaður er við hverja örvun, skal vera vel þolanlegur fyrir öll kerfi líkamans og skal vera mesti styrkur sem veldur vægri eða hóflegri ertingu í húð. Styrkur við áreiti með efninu skal vera sá mesti sem veldur ekki húðertingu. Ef þörf krefur er hægt að ákvarða hæfilegan styrk í forprófun þar sem tvö eða þrjú dýr eru notuð. Til greina getur komið að nota dýr úr FCA-meðferð til þess.

1.5.1.3. Verklag

1.5.1.3.1. Örvun

Dagur 0 — tilraunahópur

Sprautað er úr þremur sprautupörum, 0,1 ml hver sprauta, í húðina á herðakambinum, sem áður er búið að fjarlægja hárf, þannig að sprauturnar í hverju sprautupari eru gefnar sín hvoru megin við hrygginn.

1. sprauta: blanda í hlutfallinu 1:1 (rúmmál/rúmmál) FCA/vatn eða lífeðlisfræðileg saltlausn.

2. sprauta: prófunarefnið í heppilegu burðarefni af þeim styrk sem er valinn.

3. sprauta: prófunarefnið af þeim styrk sem er valinn, blanda í hlutfallinu 1:1 (rúmmál/rúmmál) FCA/vatn eða lífeðlisfræðileg saltlausn.

Í 3. sprautu eru vatnsleysanleg efni leyst í vatnsfasanum áður en þeim er blandað saman við FCA. Útbúin er sviflausn í FCA af fituleysanlegum eða óleysanlegum efnum áður en þeim er blandað saman við vatnsfasann. Endanlegur styrkur prófunarefnisins skal vera sá sami og í 2. sprautu.

1. og 2. sprautu er sprautað þétt saman, næst höfðinu, en þeirri þriðju aftast á prófunarsvæðinu.

Dagur 0 — samanburðarhópur

Sprautað er úr þremur sprautupörum, 0,1 ml, á sömu staði og í tilraunahópnum.

1. sprauta: blanda í hlutfallinu 1:1 (rúmmál/rúmmál) FCA/vatn eða lífeðlisfræðileg saltlausn.

2. sprauta: óblandað burðarefni.

3. sprauta: 50% af burðarefni, miðað við þyngd/rúmmál, í blöndu í hlutfallinu 1:1 (rúmmál/rúmmál) FCA/vatn eða lífeðlisfræðileg saltlausn.

5.-7. dagur — tilrauna- og samanburðarhópur

Ef efnið ertir ekki húðina er framkölluð staðbundin húðerting, um það bil tuttugu og fjórum klukkustundum fyrir staðbundnu örvunarinnngjöfina, með því að bera 0,5 ml af 10% natríumlárýlsúlfati í vaselíni á prófunarsvæðið, eftir að það hefur verið vandlega klipt og/eða rakað.

6.-8. dagur — tilraunahópur

Allt hárf er hreinsað af prófunarsvæðinu. Síupappír (2 × 4 cm) er gegnbleyttur með prófunarefninu sem er blandað saman við heppilegt burðarefni, settur á prófunarsvæðið og haldið í snertingu við það með þéttum umbúðum í 48 klukkustundir. Val burðarefnis skal vera rökstutt. Föst efni eru findyft og þeim blandað í hæfilegt burðarefni.

Vökva má nota óþynnta ef það hentar.

6.-8. dagur — samanburðarhópur

Allt hárf er hreinsað af prófunarsvæðinu. Óblandað burðarefni er sett á prófunarsvæðið á sama hátt og haldið í snertingu við það með þéttum umbúðum í 48 klukkustundir.

1.5.1.3.2. Áreiti

20.-22. dagur — tilrauna- og samanburðarhópur

Hárf er hreinsað af huppum tilrauna- og samanburðardýra. Fylla skal plástur eða hylki af prófunarefninu og festa á annan hupp dýrsins og þegar það á við má fylla plástur eða hylki af óblönduðu burðarefninu og festa á hinn huppinn. Plástrunum er haldið í snertingu við húðina með þéttum umbúðum í 24 klukkustundir.

1.5.1.3.3. Skoðun og flokkun: tilrauna- og samanburðarhópur

- um það bil 21 klukkustund eftir að plásturinn er fjarlægður er áreitissvæðið hreinsað og snöggklippt og/eða rakað ef með þarf;
- um það bil þremur klukkustundum síðar (um það bil 48 klukkustundum eftir að áreitisskammturinn er borinn á) eru viðbrögð húðarinnar skoðuð og skráð samkvæmt flokkuninni sem er sýnd í viðbætinum;
- um það bil 24 klukkustundum eftir þessa athugun er önnur athugun gerð (72 klukkustundir) og skráð.

Mælt er með því að sá sem athugar dýrin viti ekki hvort þau eru úr tilrauna- eða samanburðarhópnum.

Ef nauðsynlegt er að skýra niðurstöðurnar úr fyrstu áreitismeðferð kemur til greina að hafa aðra áreitismeðferð (þ.e.a.s. endurtaka hana), hugsanlega með öðrum samanburðarhópi, viku eftir fyrsta áreiti. Einnig má nota upphaflega samanburðarhópinn í endurtekna áreitismeðferð.

Athuga skal og skrá öll húðviðbrögð og allt óvenjulegt, þar á meðal svörum í öllum líkamanum við örvun og áreiti með efninu, samkvæmt flokkun Magnusson/Kligman (sjá viðbæti). Nota má aðrar aðferðir, til dæmis vefjameinafræðilegar rannsóknir og mælingar á þykknun húðar, til að taka af vafa þegar viðbrögð eru ekki ótvíræð.

1.5.2. *Buehler-prófun*

1.5.2.1. Undirbúningur

Heilbrigðir, ungir, en fullvaxnir naggrísahvítungjar eru látnir aðlagast aðstæðum á tilraunastofni í að minnsta kosti 5 daga áður en prófun hefst. Fyrir prófunina er dýrunum skipt af handahófi í tilraunahópa. Hár er klippt eða rakað af eða hugsanlega fjarlægt með háreyðingarefni, eftir því hvaða prófunaraðferð er notuð. Gæta verður þess að erta ekki húðina. Dýrin eru vigtuð áður en prófunin hefst og þegar henni lýkur.

1.5.2.2. Prófunaraðstæður

1.5.2.2.1. Tilraunadýr

Notaðir eru naggrísahvítungjar af algengum rannsóknarstofustofni.

1.5.2.2.2. Fjöldi og kyn

Nota má kvendýr og/eða karldýr. Ef kvendýr eru notuð mega þau ekki hafa gotið og ekki vera kviðug.

Nota skal minnst 20 dýr í tilraunahópnum og að minnsta kosti 10 dýr í samanburðarhópnum.

1.5.2.2.3. Skammtastærðir

Sá styrkur prófunarefnisins, sem notaður er við hverja örvun, skal vera mesti mögulegi styrkur sem veldur vægri, en ekki of mikilli, ertingu í húð. Styrkur við áreiti með efninu skal vera sá mesti sem veldur ekki húðertingu. Ef þörf krefur er hægt að ákvarða hæfilegan styrk í forprófun þar sem tvö eða þrjú dýr eru notuð.

Þegar um er að ræða vatnsleysanleg efni er rétt að nota sem burðarefni vatn eða þynnta lausn af yfirborðsvirku efni og má sú lausn ekki vera ertandi. Þegar um er að ræða önnur prófunarefni er betra að nota 80% etanól-/vatnsblöndu fyrir örvun og aseton fyrir áreiti.

1.5.2.3. Verklag

1.5.2.3.1. Örvun

Dagur 0 — tilraunahópur

Allt hár er hreinsað af öðrum huppi dýranna (snöggklippt). Prófunarplástrarnir skulu gegnvættir í prófunarefni, blönduðu hæfilegu burðarefni (val burðarefnis skal vera vel rökstutt; nota má fljótandi prófunarefni óblönduð þegar það á við).

Prófunarplástrarnir eru festir á prófunarsvæðið og haldið í snertingu við húðina með þéttum plástri eða hylki og hæfilegum umbúðum í 6 klukkustundir.

Prófunarplástrarnir verða að vera vel þéttir. Gott er að nota bómullarpúða, hringlaga eða ferhyrndan, á stærðarbilinu 4-6 cm².

Best er að takmarka hreyfingu dýranna með heppilegum aðferðum til að tryggja að umbúnaðurinn raskist ekki. Ef vafningar eru notaðir kann að vera þörf á frekari prófunum.

Dagur 0 — samanburðarhópur

Allt hár er hreinsað af öðrum huppi dýranna (snöggklippt). Óblandað burðarefnið er sett á dýrin á sama hátt og gert er við tilraunahópinn. Prófunarplástrunum er haldið í snertingu við húðina með þéttu bindi eða hylki og hæfilegum umbúðum í 6 klukkustundir. Ef hægt er að sýna fram á að ekki þurfi að nota samanburðarhóp sem fær sýndarmeðferð má nota samanburðarhóp sem hefur ekki gengist undir prófun.

6.-8. og 13.-15. dagur — tilraunahópur og samanburðarhópur

Á 6.-8. degi, og aftur á 13.-15. degi, fá dýrin samskonar meðferð og á degi 0, á sama prófunarsvæði (hár er fjarlæggt ef þess þarf) og á sama hupnum.

1.5.2.3.2. Áreiti

27.-29. dagur — tilrauna- og samanburðarhópur

Hár er hreinsað (snöggklippt) af hinum huppi dýranna í tilrauna- og samanburðarhópnum. Vel þéttur plástur eða hylki sem í er hæfilegt magn af prófunarefninu, af mesta styrk sem veldur ekki ertingu, er sett aftast á hupp tilrauna- og samanburðardýranna.

Þegar það á við má einnig setja vel þéttan plástur eða hylki, með óblönduðu burðarefni, fremst á hupp tilrauna- og samanburðardýranna.

Plástrum eða hylkjum er haldið í snertingu við húðina í 6 klukkustundir með heppilegum umbúðum.

1.5.2.3.3. Skoðun og flokkun

- um það bil 21 klukkustund eftir að plásturinn er fjarlægður er allt hár hreinsað af áreitissvæðinu;
- um það bil þremur klukkustundum síðar (um það bil 30 klukkustundum eftir að áreitiplásturinn er settur á) eru viðbrögð húðar athuguð og skráð samkvæmt flokkuninni sem er sýnd í viðbætinum;
- um það bil 24 klukkustundum eftir 30 klukkustunda athuginina (um það bil 54 klukkustundum eftir að áreitiplásturinn er settur á) eru viðbrögð húðar aftur athuguð og skráð.

Mælt er með því að sá sem athugar dýrin viti ekki hvort þau eru úr tilrauna- eða samanburðarhópnum.

Ef nauðsynlegt er að skýra niðurstöðurnar úr fyrstu áreitismeðferð kemur til greina að endurtaka hana (enduráreiti), hugsanlega með nýjum samanburðarhópi, viku eftir fyrsta áreiti. Einnig má nota upphaflega samanburðarhópinn í endurtekna áreitismeðferð.

Athuga skal og skrá öll húðviðbrögð og allt óvenjulegt, þar á meðal svörun í öllum líkamanum við örvun og áreiti með efninu, samkvæmt flokkun Magnusson/Kligman (sjá viðbæti). Nota má aðrar aðferðir, til dæmis vefjameinafræðilegar rannsóknir og mælingar á þykkun húðar, til að taka af vafa þegar viðbrögð eru ekki ótvíræð.

2. GÖGN (GPMT OG BUEHLER)

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur svörun húðarinnar hjá hverju dýri í hverri athugun um sig.

3. SKÝRSLUGERÐ (GPMT OG BUEHLER)

Ef skimunarprófun er undanfari naggrísaprófunarinnar, verður að gefa lýsingu á eða vísun í þá prófun (til dæmis Local Lymph Node Assay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST)), þar á meðal lýsingu á verklagi við prófun, ásamt þeim niðurstöðum sem hafa fengist með notkun prófunar- og viðmiðunarefna.

Prófunarskýrsla (GMPT og Buehler-prófun)

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

- naggrísastofninn sem er notaður;
- fjöldi, aldur og kyn dýranna;
- uppruni, umhverfi á rannsóknarstofu, fóður o.s.frv.;
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunaraðstæður:

- aðferð við undirbúning svæðis fyrir plástra;
- nákvæm lýsing á plástursetnum og aðferð við plástrun;
- niðurstöður forkönnunar ásamt ályktun um hvaða styrk örvunarefnis og áreitisefnis ber að nota í prófuninni;
- nákvæm lýsing á því hvernig prófunarefni eru lögð, sett á og fjarlægð;
- rök fyrir vali á burðarefni;
- styrkur burðarefnis og prófunarefnis sem er notaður til örvunar og áreitis og heildarmagn efna sem notuð eru til örvunar og áreitis.

Niðurstöður:

- Samantekt á niðurstöðum síðustu athugunar á næmi og áreiðanleika (sjá 1.3), þar á meðal upplýsingar um efni, styrk þess og það hvaða burðarefni er notað;
- upplýsingar um hvert einstakt dýr, þar á meðal flokkunarkerfi;
- lýsing í samfelldu máli á eðli og styrk áhrifanna sem koma í ljós;
- vefjameinafræðilegar niðurstöður.

*Umfjöllun um niðurstöður.**Ályktanir.***4. HEIMILDIR**

Þessi aðferð svarar til TG 406 frá OECD.

Viðbætur

TAFLA:

Flokkunarkvarði Magnusson/Kligman fyrir mat á svörun við áreitissprófun með plástrum

- 0 = engin merkjanleg breyting
 - 1 = afmarkaður hörundsroði eða í blettum
 - 2 = vægur og samfelldur hörundsroði
 - 3 = mikill hörundsroði og bólga“
-

IV. VIÐAUKI D

„B.7 EITURHRIF EFTIR ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR) (INNGJÖF UM MUNN)

1. **AÐFERÐ**1.1. **Inngangur**

Sjá almennan inngang, B-hluta.

1.2. **Skilgreiningar**

Sjá almennan inngang, B-hluta.

1.3. **Meginregla prófunaraðferðarinnar**

Nokkrum hópum tilraunadýra er gefið prófunarefnið daglega um munn í stigvaxandi skömmtum, ein skammtastærð á hvern hóp í 28 daga. Dýrin eru skoðuð daglega á inngjafartímabilinu til að greina merki um eiturhrif. Dýr sem drepast eða eru aflífuð á meðan prófunin stendur yfir eru krufin og þegar prófun lýkur eru dýrin, sem lifa af, aflífuð og krufin.

Í þessari aðferð er lögð meiri áhersla á taugafræðileg áhrif sem sérstakt lokastig (end-point) 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 efni sem geta valdið taugaeiturhrifum, en slíkt getur gefið tilefni til meiri og ítarlegri rannsókna. Þar að auki geta komið fram visbendingar um ónæmisfræðileg áhrif og eiturhrif í æxlunarlíffærum þegar þessari aðferð er beitt.

1.4. **Lýsing á prófunaraðferðinni**1.4.1. *Undirbúningur*

Heilbrigð, ung, fullvaxin dýr eru valin af handahófi í samanburðar- og tilraunahópum. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru merkt, hvert um sig, og höfð í búrum sínum í að minnsta kosti fimm daga fyrir rannsókna til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

Dýrunum er gefið prófunarefnið í inngjafarslöngu eða í fóðri eða drykkjarvatni. Aðferðin með inngjöf um munn er háð því hver tilgangurinn með tilrauninni er og eðlis-/efnafræðilegum eiginleikum efnisins.

Þegar þess gerist þörf er prófunarefnið haft uppleyst eða sem sviflausn í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota lausnir/sviflausnir í vatni ef það er hægt, en að öðrum kosti lausnir/fleyti í olíu (til dæmis máisólíu) og lausnir í öðrum burðarefnum geta einnig komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins í burðarefninu.

1.4.2. *Prófunaraðstæður*1.4.2.1. *Tilraunadýr*

Rottur eru ákjósanlegustu tilraunadýrin þótt einnig megi nota önnur nagdýr. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofni. Kvendýrin mega ekki hafa gotið og ekki vera kviðug. Efnagjöf ætti að hefjast eins fljótt og hægt er eftir að dýrin eru vanin af spena eða að minnsta kosti áður en þau eru níu vikna gömul.

Í upphafi tilraunarinnar skal þyngdarmunur dýranna vera í lágmarki og ekki víkja meira en $\pm 20\%$ frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

Þegar rannsókn með endurteknum skammti með inntöku er undanfari langtímarannsóknar er mælt með því að dýr af sama stofni og uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

1.4.2.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst 10 dýr (5 kvendýr og 5 karldýr) á hverju skammtastigi. Ef aflifa á dýr í tilrauninni, samkvæmt aðferðaráætlun, ber að fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem áformað er að aflifa fyrir lok tilraunarinnar.

Auk þess má gefa 10 dýra fylgihópi (fimm dýrum af hvoru kyni) stærsta skammt í 28 daga og fylgjast með honum með tilliti til þess hvort eiturrhifin ganga til baka eða hvort þrávirkni eða tafin áhrif koma fram í 14 daga eftir meðferð. Þá er notaður enn annar fylgihópur með 10 samanburðardýrum (fimm af hvoru kyni).

1.4.2.3. Skammtastærðir

Almennt eru notaðir að minnsta kosti þrjú tilraunahópar og samanburðarhópur. Dýrin í samanburðarhópnum fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunarefnið. Ef burðarefni er notað við inngjöf prófunarefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammt sem er notaður af burðarefninu.

Ef önnur gögn gefa ekki ástæðu til að vænta neinna áhrifa af skammti sem er 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, er hægt að framkvæma markprófun. Ef ekki eru til viðeigandi gögn er hægt að gera athugun til að finna mörk sem auðvelda ákvörðun á því hvaða skammtastærðir skuli nota.

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturrhif og (eiturefna)ferla prófunarefnis eða skyldra efna. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann valdi eiturrhifum en ekki dauða eða miklum þjáningum. Eftir það eru valdir skammtar sem fara stigminnkandi til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við neðstu skammtamörk (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2 - 4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða hópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (til dæmis stærri en stuðulinn tíu).

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn í fóðri eða drykkjarvatni er áriðandi að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vatnsjafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með fóðri á annaðhvort að nota fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna; taka ber fram hvor leiðin er farin. Ef efnið er gefið með magaslöngu á að gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og jafna hann eftir þörfum þannig að skammtastærð sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýranna.

Þegar rannsókn með endurteknum skömmtum er undanfari langtímarannsóknar skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

1.4.2.4. Markprófun

Ef engin merkjanleg eiturrhif koma fram í prófun með einni skammtastærð sem er að minnsta kosti 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, eða samsvarandi hluti í fóðri eða drykkjarvatni (byggist á ákvörðun líkamsþyngdar), og notað er verklag, sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturrhifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem hafa samsvarandi byggingu, þá er ekki talin ástæða til fullrar rannsóknar með þremur mismunandi skammtastærðum. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.4.2.5. Athugunartímabil

Athugunartímabilið skal vera 28 dagar. Dýr í fylgihóp, sem nota á til framhaldsathugana, skal geyma í að minnsta kosti 14 daga til viðbótar án meðferðar til að hægt sé að fylgjast með töfðum einkennum, þrávirkni eða bata eftir eiturrhif.

1.4.3. Verklag

Dýrin fá skammt af prófunarefninu daglega, sjö daga vikunnar í 28 daga; ef efnið er gefið 5 daga vikunnar skulu vera gild rök fyrir því. Þegar prófunarefnið er gefið með inngjafarslöngu skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inndælingarpípu. Hámarks magn vökva, sem gefa má inn í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Magnið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 gr líkamsþyngdar, nema um sé að ræða vatnslausnir, en þá má gefa 2 ml/100 gr líkamsþyngdar. Að undanskildum ertandi eða ætandi efnum, sem venjulega hafa í för með sér verri áhrif eftir því sem styrkurinn eykst, skal halda rúmmálsfrávikum efnisins í lágmarki með því að stilla styrk þess þannig að rúmmál haldist jafnt hver sem skammturinn er.

1.4.3.1. Almennar athuganir

Gera skal almennar, klínískar athuganir að minnsta kosti einu sinni á dag, helst á sama tíma/sömu tímum á hverjum degi og með það í huga hvenær vænta má hámarksáhrifa af inngjöfnni. Skrá skal heilbrigðisástand dýranna. Öll dýr eru skoðuð að minnsta kosti tvisvar á dag með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Dauðvona dýr og dýr sem þjást skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflifa þau mannúðlega og kryfja þau.

Gera skal ítarlegar klínískar athuganir á öllum dýrunum, einu sinni fyrir fyrstu váhrif (til að hægt sé að gera samanburð á ástandi hvers einstaks dýrs), og að minnsta kosti vikulega eftir það. Þessar rannsóknir skal gera annars staðar en í búri dýranna, í stöðluðu rými og helst alltaf á sama tíma. Þær skulu vandlega skráðar og best er að nota skýrt skilgreint stigakerfi, unnið af rannsóknarstofunni sem annast prófanirnar. Áriðandi er að tryggja að prófunarskilyrði séu sem jöfnust og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til meðferðarinnar. Athuganirnar skulu meðal annars beinast að breytingum í húð, feldi, augum, slímhúð, merkjum um seytingu og úrgangslösum og ósjálfráðri starfsemi (til dæmis társeytingu, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og hreyfingar sem stafa af vöðvakippun og vöðvaspennu, einhliða atferli (til dæmis ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hring) eða afbrigðilegt atferli (til dæmis sjálfssköddun eða ef dýrin ganga afturábak).

Í fjórðu váhrifaviku ætti að fara fram mat á viðbrögðum við skynáreiti af ýmsu tagi (til dæmis heyrnar-, sjón-, stöðu- og hreyfiskynáreiti), gripstyrk og hreyfistarfsemi. Nánari lýsingar á rannsóknaraðferðum sem hægt er að beita er að finna annars staðar (sjá almennan inngang, B-hluta).

Sleppa má athugunum á starfrænum þáttum í fjórðu váhrifaviku, þegar um er að ræða forathugun sem er undanfari 90 daga rannsóknar á hálfangvinnnum eiturhrifum. Í þeim tilvikum ættu athuganir á starfrænum þáttum að vera hluti af síðari rannsókninni. Hins vegar geta upplýsingar um starfræna þætti úr rannsókn með endurteknum skammti auðveldað valið á skammtastærðum fyrir síðari rannsóknir á hálfangvinnnum eiturhrifum.

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 prófun á starfrænum þáttum.

1.4.3.2. Líkamsþyngd og neysla fôðurs/vatns

Vígta skal öll dýr að minnsta kosti vikulega. Mæla skal fôður- og vatnsneyslu að minnsta kosti vikulega. Ef prófunarefnið er gefið í drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsneyslu vikulega.

1.4.3.3. Blóðfræði

Í lok prófunartímabilsins eru gerðar eftirfarandi blóðrannsóknir: rannsókn á blóðkornaskilum og blóðrauðamagni, talning rauðra blóðkorna, heildar- og deilitalning hvítra blóðkorna, blóðflögutalning og mæling á storknunarhæfni blóðs á tímaeiningu.

Taka skal blóðsýni á tilteknum stað rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð og geyma þau við hæfileg skilyrði.

1.4.3.4. Klínísk lífefnafræði

Framkvæma skal klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum sem tekin eru úr öllum dýrum rétt áður eða um leið og dýrin eru aflífuð (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð í tilrauninni) til að rannsaka helstu eiturhrif í vefjum, einkum áhrif á nýru og lifur. Mælt er með því að dýrin séu fastandi nóttina áður en blóðsýnin eru tekin (¹). Rannsóknir á vessavökva og blóðvökva skulu ná yfir natríum, kalíum, glúkósa, heildarkólesteról, þvagefni, kreatínín, heildarprótín og albúmín, að minnsta kosti tvö ensím sem geta bent til áhrifa á lifrarfrumur ef þau finnast (til dæmis alanín-aminótransferasi, aspartat-aminótransferasi, alkalífosfatasi, gamma glútamýl-transpeptíðasi og sorbitólvetnisviptir). Mælingar á fleiri ensímum (úr lifur eða öðrum líffærum) og gallsírum geta í sumum tilvikum gefið gagnlegar upplýsingar.

(¹) Við allmargar mælingar á blóðvökva og vessavökva, og sérstaklega á glúkósa, er betra að láta dýrin fasta yfir nótt. Aðalástæðan er sú að óhjákvæmilega verða niðurstöður breytilegri ef það er ekki gert og það getur falið þau áhrif sem eru lítt áberandi og gert túlkun erfðari. Á hinn bóginn gæti fasta yfir nótt haft áhrif á almenn efnaskipti dýrsins og getur það truflað dagleg váhrif frá prófunarefninu, einkum í rannsóknum þar sem efnin eru gefin inn með fôðri. Ef dýrin eru látin fasta yfir nótt skulu klínískar lífefnafræðilegar mælingar gerðar eftir að athuganir á starfrænum þáttum í 4. viku rannsóknarinnar hafa farið fram.

Ef vill má gera eftirfarandi greiningar á þvagi, sem tekið er á föstum tímum, í síðustu viku rannsóknarinnar til ákvörðunar á: útliti, magni, osmósúþéttni eða eðlismassa, pH-gildi, prótíni, glúkósa og blóði/blóðkornum.

Að auki má hugsanlega rannsaka sermimerki almennra vefjaskemmda.

Aðrar mælingar, sem ber að gera ef þekktir eiginleikar prófunarefnisins geta haft eða búist er við að þeir hafi áhrif á tilsvarendi efnaskiptamynstur, ná yfir kalsíum, fosfat, þriglýseríð við föstu, tiltekna hormóna, methemóglóbín og kólínestrása. Greina þarf þessa þætti þegar um er að ræða efni í ákveðnum flokkum eða í hverju einstöku tilviki.

Almennt þarf tilhögun að vera sveigjanleg eftir tegundum og þeim áhrifum sem koma fram og/eða búist er við af tilteknu efni.

Ef ekki liggja fyrir fullnægjandi gögn úr fyrri rannsóknum getur komið til greina að ákvarða blóðfræðilegar og klínískar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst.

1.4.3.5. Stórsæ krufning

Fara skal fram gagnger, stórsæ krufning á öllum dýrum í rannsókninni, meðal annars skal rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Losa skal alla aðliggjandi vefi frá lifur, nýrum, nýrnahettum, eistum, eistalyppum, hóstarkirtli, milta, heila og hjarta allra dýranna, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir vefjafláningu svo að þau þorni ekki.

Varðveita skal eftirfarandi vefi í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefs og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heila (helstu svæði, þar á meðal stórheila, litla heila og heilabru), mænu, maga, garnir og þarma (þar á meðal fjöleitlinga (Peyer's patches)), lifur, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, hóstarkirtil, skjaldkirtil, barka og lungu (varðveitt með fyllingu af festiefni og síðan idýfingu), kynkirtla, kynbundin líffæri (til dæmis leg og blöðruhálskirtil), þvagblöðru, eitla (helst einn eitil nálægt inngjafarleiðinni og annan langt frá henni, til að sýna áhrif í öllum líkamanum), úttaug (set- eða sköflungstaug) helst í námunda við vöðvann, og sneið af beinmerg (í staðinn má nota nýlegt beinmergssýni). Niðurstöður, bæði klínískar og aðrar, geta leitt í ljós að rannsaka verði fleiri vefi. Einnig ber að geyma öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri, miðað við þekkta eiginleika prófunarefnisins.

1.4.3.6. Vefjameinafræðileg rannsókn

Framkvæma skal gagngera vefjameinafræðilega rannsókn á líffærum og vefjum sem eru varðveitt úr dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Þessar rannsóknir skulu einnig ná til dýra úr öllum öðrum skammtahópnum ef breytingar, sem rekja má til meðferðarinnar, koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

Ef notaður er fylgihópur ber að framkvæma vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturrhif í tilraunahópnum.

2. GÖGN

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp skal auk þess taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern hóp í prófuninni, fjöldi dýra við upphaf prófunarinnar, fjöldi dýra sem drepast meðan á prófun stendur eða eru aflífuð af mannúðarástæðum, tímasetning dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi þeirra sem sýna merki um eiturrhif, lýsing á þeim merkjum sem sjást um eiturrhif, þar á meðal hvenær þau koma fram, hve lengi þau standa og hve alvarleg eiturrhifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, hvers konar vefjaskemmdir það eru og hundraðshluti dýranna sem sýna merki um hverja tegund vefjaskemmda.

Þegar unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðiaðferðir um leið og tilhögun rannsóknarinnar er ákveðin.

3. **SKÝRSLUGERÐ****Prófunarskýrsla**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

- tegund/stofn;
- fjöldi, aldur og kyn dýranna;
- uppruni, umhverfi á rannsóknarstofu, fóður o.s.frv.;
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, vikulega eftir það og við lok prófunar.

Prófunaraðstæður:

- forsendur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn;
- rök fyrir vali á skammtastærð;
- lýsing á samsetningu prófunarefnisins/blöndun í fóður, styrk efnisins og stöðugleika og einsleitni blöndunnar;
- lýsing á því hvernig efnið er gefið;
- umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í föðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag) þegar við á.
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns;

Niðurstöður:

- líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd;
- fóðurneysla og vatnsneysla, þegar við á;
- upplýsingar um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þar á meðal merki um eiturrhif;
- eðli ummerkja við klíniska athugun, hve alvarleg þau eru og hve lengi þau standa (hvort áhrifin ganga til baka eða ekki);
- mat á starfsemi skynfæra, gripstyrk og hreyfistarfsemi;
- blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum
- klínískar lífefnaprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum;
- upplýsingar um líkamsþyngd við aflifun og þyngd líffæra;
- niðurstöður krufningar;
- nákvæm lýsing á vefjameinafræðilegum niðurstöðum;
- gögn um frásög ef þau eru til;
- tölfræðilegar upplýsingar um niðurstöður, þegar við á.

*Umfjöllun um niðurstöður.**Ályktanir.*4. **HEIMILDIR**

Þessi aðferð svarar til TG 407 frá OECD.“

IV. VIÐAUKI E

„B.37 TAFIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM LÍFRÆNNA FOSFÓREFNA EFTIR BRÁÐ VÁHRIF1. **ADFERÐ**1.1. **Inngangur**

Begar eiturrhif efna eru metin er áriðandi að hafa í huga getu tiltekinna efnaflökka til að valda sérstökum tegundum taugaeiturhrifa, sem óvíst er að finnist í öðrum rannsóknum á eiturrhifum. Komið hefur í ljós að sum lífræn fosfórefni valda töfðum taugaeiturhrifum og ber að rannsaka þau með tilliti til þess.

Nota má skimunarprófanir í glasi til að sanngreina þau efni sem geta valdið töfðum fjöltaugakvillum; neikvæðar niðurstöður af rannsóknum í glasi eru þó ekki sönnun þess að prófunarefni valdi ekki taugaeitrun.

Sjá almennan inngang, B-hluta.

1.2. **Skilgreiningar**

Lífræn fosfórefni eru óhlaðnir, lífrænir estrar, þíóestrar og anhýdríð af lífrænum fosfórsýrum, fosfónsýrum, eða fosfóramíðsýrum eða samsvarandi fosfórþíósýrum, fosfónþíósýrum eða fosfórþíóamíðsýrum eða önnur efni sem geta valdið töfðum eiturrhifum sem stundum koma fram í þessum efnaflokki.

Tafin taugaeiturhrif eru heilkenni tengd lengdri, tafinni byrjun slingurs, fjarlægum (tauga)símakvilla í mænu og úttaugum og hömlun og öldrun taugakvillaestrakljúfs (NTE) í taugavef.

1.3. **Viðmiðunarefni**

Prófa má viðmiðunarefni á jákvæðum samanburðarhópi til að sýna að við prófunaraðstæður á rannsóknarstofu hafi ekki orðið marktækar breytingar á svörun tegundanna sem eru prófaðar.

Dæmi um mikið notað efni sem hefur eiturrhif á taugar er trí-ó-tólýlfosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-flokkunarkerfi: fosfórsýra, tris(2-metýlfenýl)estri), einnig þekkt sem tris-ó-kresýlfosfat.

1.4. **Meginregla prófunaraðferðarinnar**

Varphænum, sem hafa verið varðar fyrir bráðri kólinvirkni ef þess hefur þurft við, er gefið prófunarefnið um munn í einum skammti. Fylgst er með dýrunum í 21 dag með tilliti til afbrigðilegs atferlis, slingurs og lómunar. Gerðar eru lífefnafræðilegar mælingar, einkum á hömlun taugakvillaestrakljúfs (NTE), á hænum sem eru valdar af handahófi úr hverjum hópi, venjulega 24 og 48 klukkustundum eftir inngjöf. Tuttugu og einum degi eftir váhrif eru hænurnar, sem eftir eru, aflífaðar og gerðar vefjameinafræðilegar rannsóknir á völdum taugavefjum.

1.5. **Lýsing á prófunaraðferðinni**1.5.1. *Undirbúningur*

Heilbrigðar, ungar, fullvaxnar hænur, sem ganga eðlilega og eru lausar við veirusjúkdóma og lyfjagjöf sem getur truflað rannsóknina, skulu valdar af handahófi, settar í tilrauna- og samanburðarhópa og láttnar venjast aðstæðum á rannsóknarstofunni í að minnsta kosti 5 daga áður en rannsóknin hefst.

Notuð eru búr eða hólf sem eru nógu stór til að hænurnar geti hreyft sig óhindrað og auðvelt sé að fylgjast með gangi þeirra.

Að jafnaði skal gefa prófunarefnið um munn og nota magaslöngu, gelatínhyliki eða sambærilega aðferð. Vökva má gefa óblandaða eða uppleysta í viðeigandi burðarefni, til dæmis maisolíu; föst efni skal leysa upp ef unnt er þar eð hætta er á að upptaka stórra skammta af föstu efni í gelatínhylkjum gangi ekki auðveldlega. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir, en að öðrum kosti skal ákvarða þá fyrir prófunina.

1.5.2. *Prófunaraðstæður*

1.5.2.1. Tilraunadýr

Mælt er með því að nota ungar, fullvaxnar varphænur (*Gallus gallus domesticus*), 8 til 12 mánaða gamlar. Nota skal kyn og stofna af venjulegri stærð og hænurnar ættu að jafnaði að hafa verið aldar við þau skilyrði að geta hreyft sig óhindrað.

1.5.2.2. Fjöldi og kyn

Auk tilraunahópsins skal nota bæði samanburðarhóp, sem er gefið burðarefni, og jákvæðan samanburðarhóp. Sama 4nburðarhópurinn, sem fær burðarefni, er meðhöndlaður alveg á sama hátt og tilraunahópurinn að öðru leyti en því að prófunarefnið er ekki gefið.

Nota skal nægilega margar hænur í hverjum hópi til að aflífa megi að minnsta kosti sex fugla til lífeðlisfræðilegra athugana (þrjá í einu á tveimur völdum tímupunktum) og sex þeirra geti lifað í 21 dag vegna meinafræðilegra athugana.

Hægt er að rannsaka jákvæða samanburðarhópinn samtímis eða styðjast við athuganir á nýlegum samanburðarhópi. Í honum skulu vera að minnsta kosti sex hænur sem fá meðferð með þekktu efni sem veldur töfðum taugaeiturhrifum, þrjár hænur til lífeðlisfræðirannsókna og þrjár til meinafræðirannsókna. Mælt er með því að fyrri gögn séu uppfærð reglulega. Vinna skal upp ný gögn um jákvæða samanburðarhópinn ef rannsóknarstofan, sem framkvæmir prófunina, breytir þýðingarmiklum atriðum (til dæmis stofni, föðri eða umhverfisaðstæðum).

1.5.2.3. Skammtastærðir

Gera skal forathugun með hæfilega mörgum hænum og skammtastærðum til að unnt sé að ákveða hvaða skammtastærðir skuli nota í aðalrannsókninni. Í þessari forathugun eru einhver dauðsföll að jafnaði nauðsynleg til að hægt sé að skilgreina hæfilegan skammt fyrir aðalrannsóknina. Til þess að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra kólvirkra áhrifa má þó nota atrópín eða önnur verndandi efni sem vitað er að hafa ekki áhrif á tafða taugaeitursvörun. Nota má ýmsar prófunaraðferðir til að meta hámarksskammt af prófunarefnum sem veldur ekki dauða (sjá aðferð B.1 bis). Gögn úr fyrri rannsóknum á hænum eða aðrar eiturefnafræðilegar upplýsingar geta einnig komið að gagni við val á skammtastærð.

Nota ber eins stóra skammta af prófunarefni og hægt er í aðalrannsókninni, að teknu tilliti til niðurstaðna forathugunar á skammtastærð og efri marka skammtastærðar sem eru 2 000 mg/kg líkamsþyngdar. Dauðsföll mega ekki vera fleiri en svo að nógu mörg dýr haldi lífi fyrir lífeðlisfræðirannsóknir (sex) og meinafræðirannsóknir (sex) eftir 21 dag. Nota ber atrópín eða önnur verndandi efni, sem vitað er að hafa ekki áhrif á tafða taugaeitursvörun, til að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra kólvirkra áhrifa.

1.5.2.4. Markprófun

Ef engin merkjanleg eituráhrif koma fram í prófun með skammtastærð sem er að minnsta kosti 2 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með samsvarandi byggingu kann rannsókn með stærri skammti að teljast ónauðsynleg.

Markprófunin gildir nema váhrif á menn bendi til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.5.2.5. Athugunartímabil

Athugunartímabilið skal vera 21 dagar.

1.5.3. *Verklag*

Eftir að verndandi efni hefur verið gefið inn til að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra kólvirkra áhrifa er prófunarefnið gefið inn í einum skammti.

1.5.3.1. Almennar athuganir

Athuganir skulu hefjast strax eftir váhrif. Skoða skal allar hænurnar vandlega mörgum sinnum fyrstu tvo dagana og einu sinni á dag eftir það í 21 dag eða þangað til þær eru aflifaðar samkvæmt áætlun. Skrá skal öll merki um eiturhrif, þar á meðal afbrigðilegt atferli og hvers eðlis það er, hvenær það kemur fram, í hve miklum mæli og hve lengi það varir. Mæla skal slingur eftir talnakvarða sem skiptist í að minnsta kosti fjögur stig og skrá lömunareinkenni. Hænur, sem eru valdar til meinafræðilegra rannsókna, skulu teknar úr búrunum að minnsta kosti tvisvar í viku og látnar erfiða um tíma, til dæmis klifra í stiga, til að auðveldara sé að koma auga á lítilsháttar eiturhrif. Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu skal fjarlægja strax og eftir því er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

1.5.3.2. Líkamsþyngd

Vigta skal allar hænurnar rétt áður en þeim er gefið prófunarefnið og að minnsta kosti vikulega eftir það.

1.5.3.3. Lífefnafræði

Velja skal sex hænur af handahófi úr hverjum tilraunahóp og samanburðarhóp sem fær burðarefni og þrjár úr jákvæða samanburðarhópnum (þegar sá hópur er rannsakaður samtímis), aflífa þær fáeinum dögum eftir inngjöf og undirbúa og rannsaka heilann og lendahluta mænunnar með tilliti til hömlunar taugakvillaestrakljúfs. Að auki kann að vera gagnlegt að undirbúa og rannsaka settaugavef með tilliti til hömlunar taugakvillaestrakljúfs. Venjulega eru þrjár hænur úr samanburðarhópnum og þrjár úr hverjum tilraunahóp aflífaðar eftir 24 klukkustundir og þrjár eftir 48 klukkustundir, en þrjár hænur úr jákvæða samanburðarhópnum eru aflífaðar eftir 24 klukkustundir. Ef athugun á klínískum ummerkjum um eitrun (það má oft meta með því að athuga hvenær merki um kólvirkni koma fram) bendir til þess að eitrunarefnið skiljist mjög hægt út getur verið betra að taka tvisvar vefjasýni úr þremur fuglum, á tímabilinu frá 24 klukkustundum og upp í 72 klukkustundir eftir inngjöf.

Ef það er talið heppilegt má einnig framkvæma greiningu með tilliti til asetýlkólinkljúfs (AChE) í þessum sýnum. AChE getur þó sjálfkrafa orðið virkur aftur í lífi og þannig orðið til þess að AChE-hamlandi virkni efnisins sé vanmetin.

1.5.3.4. Stórsæ krufning

Stórsæ krufning á öllum dýrum (sem eru aflífuð samkvæmt áætlun eða þegar þau eru dauðvona) skal fela í sér athugun á útliti heilans og mænunnar.

1.5.3.5. Vefjameinafræðileg rannsókn

Rannsaka skal, í smásjá, taugavef úr dýrum sem lifa af athugunartímabilið og eru ekki notuð í lífefnafræðilegar rannsóknir.

Vefirnir eru steyptir á upphaflegum stað með gegnflæðiaðferð. Sýnin skulu tekin úr litla heila (langsníð eftir miðju), mænukylfu, mænu og úttaugum. Sýnin úr mænunni skulu tekin við efri hálsliði, mið-brjósthrygg og á mjóhryggjar-spjaldhryggjarsvæðinu. Taka skal sýni af fjarlægari hluta sköflungstaugarinnar og greinum hennar yfir í vöðva kálfans og úr settauginni. Sýnin eru lituð með sérstökum litum fyrir mýli og taugasíma.

2. GÖGN

Ef neikvæðar niðurstöður fást varðandi lokastigin (end-points) sem eru valin í þessari aðferð (lífefnafræði, vefjameinafræði og athugun á atferli) er að jafnaði ekki ástæða til frekari prófana á töfðum eiturrifum. Óviss eða ófullnægjandi árangur varðandi þessi lokastig getur gefið tilefni til frekari kannana.

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp skal auk þess taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern hóp í prófuninni, fjöldi dýra við upphaf prófunarinnar, fjöldi dýra þar sem vefjaskemmdir koma fram, atferlisleg eða lífefnafræðileg áhrif, tegund og stig vefjaskemmda eða áhrifa og hundradshluti þeirra dýra sem sýna merki um hverja tegund og hvert stig vefjaskemmda eða áhrifa.

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli tíðni, stigs og fylgni atferlislegra, lífefnafræðilegra og vefjameinafræðilegra áhrifa og allra annarra áhrifa sem koma í ljós í tilraunahópnum og samanburðarhópnum.

Meta skal tölulegar niðurstöður með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum. Velja skal tölfræðiaðferðir um leið og tilhögun rannsóknarinnar er ákveðin.

3.

SKÝRSLUGERÐ**Prófunarskýrsla**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

- stofn sem er notaður;
- fjöldi, aldur og kyn dýranna;
- uppruni, umhverfi á rannsóknarstofu o.s.frv.;
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunaraðstæður:

- ítarlegar upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, stöðugleika og einsleitni, eftir því sem við á;
- rök fyrir vali á burðarefni;
- upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið;
- upplýsingar um gæði fódurs og vatns;
- rök fyrir vali á skammtastærð;
- upplýsingar um gefna skammta, þar á meðal upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem er gefið;
- upplýsingar um verndarefni, ef um slíkt er að ræða, og hvernig það er gefið.

Niðurstöður:

- upplýsingar um líkamsþyngd;
- upplýsingar um eiturefnasvörun hvers hóps, þar á meðal dauðsföll;
- eðli ummerkja við klíniska athugun, stig þeirra og lengd (hvort þau ganga til baka eða ekki);
- nákvæm lýsing á lífefnafræðilegum aðferðum og niðurstöðum;
- niðurstöður krufningar;
- nákvæm lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum;
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, ef við á.

*Umfiðun um niðurstöður.**Ályktanir.*

4.

HEIMILDIR

Þessi aðferð svarar til TG 418 frá OECD.

B.38 TAFIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM LÍFRÆNNA FOSFÓREFNA Í 28 DAGA RANNSÓKN Á ENDURTEKNUM SKÖMMTUM**1. AÐFERÐ****1.1. Inngangur**

Þegar eiturhrif efna eru metin er áriðandi að hafa í huga getu tiltekinna efnaflokka til að valda sérstökum tegundum taugaeiturhrifa, sem óvíst er að finnist í öðrum rannsóknum á eiturhrifum. Komið hefur í ljós að sum lífræn fosfórefni valda töfðum eiturhrifum og ber að rannsaka þau með tilliti til þess.

Nota má skimunarprófanir í glasi til að sanngreina þau efni sem valda töfðum fjöltaugakvillum; neikvæðar niðurstöður úr rannsóknum í glasi eru þó ekki sönnun fyrir því að prófunarefni valdi ekki taugaeitrun.

Í þessari 28 daga rannsókn á töfðum taugaeiturhrifum fást upplýsingar um hugsanlega hættu á heilsutjóni vegna endurtekinna váhrifa í takmarkaðan tíma. Í rannsókninni fást upplýsingar um vensl svörunar og skammtastærða og með henni má leggja grundvöll að því að ákvarða hæsta skammtastig sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum áhrifum (NOAEL) en það getur komið að gagni við að ákveða öryggisviðmiðanir um váhrif.

Sjá einnig almennan inngang, B-hluta.

1.2. Skilgreiningar

Lífræn fosfórefni eru óhlaðnir, lífrænir estrar, þíóestrar og anhýdríð af lífrænum fosfórsýrum, fosfónsýrum, eða fosfóramíðsýrum eða samsvarandi fosfórþíósýrum, fosfónþíósýrum eða fosfórþíóamíðsýrum eða önnur efni sem geta valdið töfðum eiturhrifum sem stundum koma fram í þessum efnaflokki.

Tafin taugaeiturhrif eru heilkenni tengd lengdri, tafinni byrjun slingurs, fjarlægum (tauga)simakvilla í mænu og úttaugum og hömlun og öldrun taugakvillaeatrakljúfs (NTE) í taugavef.

1.3. Meginregla prófunaraðferðarinnar

Hænum eru gefnir daglegir skammtar af prófunarefninu um munn í 28 daga. Dýrin eru skoðuð að minnsta kosti einu sinni á dag í 14 daga eftir síðasta skammt með tilliti til afbrigðilegs atferlis, slingurs og lömunar. Gerðar eru lífefnafræðilegar mælingar, einkum á hömlun taugakvillaeatrakljúfs (NTE), á hænum sem eru valdar af handahófi úr hverjum hópi, venjulega 24 og 48 klukkustundum eftir síðustu inngjöf. Þegar liðnar eru tvær vikur frá síðasta skammti eru hæurnar sem eftir eru aflífaðar og gerðar vefjameinafræðilegar rannsóknir á völdum taugavefjum.

1.4. Lýsing á prófunaraðferðinni**1.4.1. Undirbúningur**

Heilbrigðar, ungar, fullvaxnar hænur, sem ganga eðlilega og eru lausar við veirusjúkdóma og lyfjagjöf sem getur truflað rannsóknina, skulu valdar af handahófi, settar í tilrauna- og samanburðarhópa og látar venjast aðstæðum á rannsóknarstofunni í að minnsta kosti 5 daga áður en rannsóknin hefst.

Notuð eru búr eða hólf sem eru nógu stór til að hæurnar geti hreyft sig óhindrað og auðvelt sé að fylgjast með gangi þeirra.

Gefa skal prófunarefnið um munn, á hverjum degi, 7 daga í viku; best er að nota magaslöngu eða gelatínhylki. Vökva má gefa óblandaða eða uppleysta í viðeigandi burðarefni, til dæmis maisolíu; föst efni skal leysa upp ef unnt er, þar eð hætta er á að upptaka stórra skammta af föstu efni í gelatínhylkjum gangi ekki auðveldlega.

Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir, en að öðrum kosti skal ákvarða þá fyrir prófunina.

1.4.2. Prófunaraðstæður**1.4.2.1. Tilraunadýr**

Mælt er með því að nota ungar, fullvaxnar varphænur (*Gallus gallus domesticus*), 8 til 12 mánaða gamlar. Nota skal kyn og stofna af meðalstærð og hæurnar ættu að jafnaði að hafa verið aldar við þau skilyrði að geta hreyft sig óhindrað.

1.4.2.2. Fjöldi og kyn

Að jafnaði skal nota að minnsta kosti þrjú tilraunahópa og samanburðarhóp sem er gefið burðarefni. Hópurinn, sem fær burðarefni, er meðhöndlaður alveg á sama hátt og tilraunahópurinn, að öðru leyti en því að prófunarefnið er ekki gefið.

Nota skal nægilega margar hænur í hverjum hópi til að aflífa megi að minnsta kosti sex fugla til lífeðlisfræðilegra athugana (þrjú í einu á tveimur völdum tímupunktum) og sex geti lifað í 14 daga eftir meðferð vegna meinafræðilegra rannsókna.

1.4.2.3. Skammtastærðir

Velja skal skammtastærðir með tilliti til þriggja niðurstaðna úr bráðaprófun á töfðum taugaeiturhrifum og annarra gagna sem eru til um eiturrhif og eiturefnaferla prófunarefnisins. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann valdi eiturrhifum, helst töfðum taugaeiturhrifum, en ekki dauða eða auðsæjum þjáningum. Eftir það eru valdir skammtar sem fara stigminnkandi til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við neðstu skammtamörk.

1.4.2.4. Markprófun

Ef engin merkjanleg eiturrhif koma fram í prófun með skammtastærð sem er að minnsta kosti 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag og ef eiturrhifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni með samsvarandi byggingu kann rannsókn með stærri skammti að teljast ónaúðsynleg. Markprófunin gildir nema váhrif á menn bendi til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.4.2.5. Athugunartímabil

Athuga skal öll dýrin að minnsta kosti daglega á váhrifatímabilinu og í 14 daga eftir það, nema krufning sé fyrirhuguð.

1.4.3. Verklag

Dýrunum er gefið prófunarefnið á hverjum degi í 28 daga.

1.4.3.1. Almennar athuganir

Athuganir skulu hefjast strax eftir að meðferð hefst. Skoða skal allar hænurnar vandlega að minnsta kosti einu sinni á dag þá 28 daga sem meðferðin stendur og í 14 daga eftir það eða þangað til þær eru aflífaðar samkvæmt áætlun. Skrá skal öll merki um eiturrhif, hvenær þau koma fram, af hvaða tegund þau eru, í hve miklum mæli og hve lengi þau standa. Athuganir skulu ná til afbrigðilegs atferlis, en ekki einskorðast við það. Mæla skal slingur eftir talnakvarða sem skiptist í að minnsta kosti fjögur stig og skrá lömunareinkenni. Hænurnar skulu teknar úr búrunum að minnsta kosti tvisvar í viku og láttnar erfíða um tíma, til dæmis klifra í stiga, til að auðveldara sé að koma auga á lítilsháttar eiturrhif. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu, skal fjarlægja strax og eftir því er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

1.4.3.2. Líkamsþyngd

Vigta skal allar hænurnar rétt áður en þeim er gefið prófunarefnið og að minnsta kosti vikulega eftir það.

1.4.3.3. Lífefnafræði

Velja skal sex hænur af handahófi úr hverjum tilraunahóp og samanburðarhóp sem fær burðarefni, aflífa þær fæinum dögum eftir síðasta skammt og undirbúa og rannsaka heilann og lendahluta mæunnar með tilliti til hömlunar taugakvillastrakljúfs (NTE). Að auki kann að vera nauðsynlegt að undirbúa og rannsaka hömlun taugakvillastrakljúfs í settaugavef. Venjulega eru þrjár hænur úr samanburðarhópnum og þrjár úr hverjum tilraunahóp aflífaðar eftir 24 klukkustundir og þrjár 48 klukkustundum eftir síðasta skammt. Ef gögn úr rannsókninni á bráðum eiturrhifum eða öðrum rannsóknum (til dæmis rannsókn á eiturefnaferlum) bendir til þess að betra sé að aflífa fuglana á öðrum tímum eftir síðasta skammt skal gera það og skrá ástæðurnar fyrir því.

Ef það er talið heppilegt má einnig framkvæma greiningu með tilliti til asetýlkólinkljúfs (AChE) í þessum sýnum. AChE getur þó sjálfkrafa orðið virkur aftur í lífi og þannig orðið til þess að AChE-hamlandi virkni efnisins sé vanmetin.

1.4.3.4. Stórsæ krufning

Stórsæ krufning á öllum dýrum (sem eru aflífuð samkvæmt áætlun eða þegar þau eru dauðvona) skal fela í sér athugun á útliti heilans og mæunnar.

1.4.3.5. Vefjameinafræðileg rannsókn

Rannsaka skal, í smásjá, taugavef úr dýrum sem lifa af athugunartímabilið og eru ekki notuð í lífefnafræðilegar rannsóknir. Vefirnir eru steypfir á upphaflegum stað með gegnflæðiaðferð. Sýnin skulu tekin úr litla heila (langsnið eftir miðju), mænukylfu, mænu og úttaugum. Sýnin úr mænunni skulu tekin við efri hálsliði, mið-brjósthrygg og á mjóhryggjar-spjaldhryggjarsvæðinu. Taka skal sýni af fjarlægari hluta sköflungstaugarinnar og greinum hennar yfir í vöðva kálfans og úr settauginni. Sýnin eru lituð með sérstökum litum fyrir mýli og taugasíma. Í upphafi skal gera smásjárrannsókn á varðveittum vefjum úr öllum dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammt. Þegar merki koma fram um áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig fara fram smásjárrannsókn á hænum í hópnum sem fá meðalstóran og lítinn skammt.

2. GÖGN

Ef neikvæður niðurstöður fást varðandi lokastigin (end-points) sem eru valin í þessari aðferð (lífefnafræði, vefjameinafræði og athugun á atferli) er að jafnaði ekki ástæða til frekari prófana á töfðum eiturhrifum. Óvissar eða ófullnægjandi niðurstöður varðandi þessi lokastig geta gefið tilefni til frekari kannana.

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp skal auk þess taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur fjöldi dýra við upphaf prófunarinnar, fjöldi dýra þar sem vefjaskemmdir koma fram, atferlisleg eða lífefnafræðileg áhrif, tegund og stig vefjaskemmda eða áhrifa og hundradshluti þeirra dýra sem sýna merki um hverja tegund og hvert stig vefjaskemmda eða áhrifa.

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli tíðni, stigs og fylgni atferlislegra, lífefnafræðilegra og vefjameinafræðilegra áhrifa og allra annarra áhrifa sem koma í ljós í tilrauna- og samanburðarhópnum.

Meta skal tölulegar niðurstöður með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum. Velja skal tölfræðiaðferðir um leið og snið rannsóknarinnar er ákveðið.

3. SKÝRSLUGERÐ

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

- stofn sem er notaður;
- fjöldi, aldur og kyn dýranna;
- uppruni, umhverfi á rannsóknarstofu o.s.frv.;
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunaraðstæður:

- ítarlegar upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, stöðugleika og einsleitni, eftir því sem við á;
- rök fyrir vali á burðarefni;
- upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið;
- upplýsingar um gæði fôðurs og vatns;
- rök fyrir vali á skammtastærð;
- upplýsingar um gefna skammta, þar á meðal upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem gefið er;
- rök fyrir því að velja aðra tíma fyrir lífefnafræðilegar ákvarðanir en eftir 24 og 48 klukkustundir.

Niðurstöður:

- upplýsingar um líkamsþyngd;
- upplýsingar um eiturefnasvörun eftir skammtastærðum, þar á meðal dauðsföll;
- hæsta skammtastig sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum áhrifum;
- eðli ummerkja við klíniska athugun, stig þeirra og lengd (hvort þau ganga til baka eða ekki);
- nákvæm lýsing á lífefnafræðilegum aðferðum og niðurstöðum;
- niðurstöður krufningar;
- nákvæm lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum;
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, þar sem við á.

*Umfjöllun um niðurstöður.**Ályktanir.*

4.

HEIMildir

Þessi aðferð svarar til TG 419 frá OECD.“

—

V. VIÐAUKI

A. 8. og 9. þáttur í efnisyfirliti viðaukans breytast sem hér segir:

- „8. SÉRTILVIK: efni
- 8.1. Færanleg gashylki
- 8.2. Gashylki undir própan, bútan eða fljótandi jarðolíugas (LPG)
- 8.3. Gegnheilir málmar
- 8.4. Efni sem eru flokkuð með H65
- 9. SÉRTILVIK: Efnablöndur
- 9.1. Loftkenndar efnablöndur (gasblöndur)
- 9.2. Gashylki undir efnablöndur sem innihalda ilmbætt própan, bútan eða fljótandi jarðolíugas (LPG)
- 9.3. Málmblandi, efnablöndur sem innihalda fjölliður, efnablöndur sem innihalda gúmmílíki
- 9.4. Efnablöndur sem eru flokkaðar með H65
- 9.5. Lífræn peroxíð“

B. Eftirfarandi texti bætist við í lið 3.2.3. á eftir viðmiðunum fyrir H20 „Hættulegt við innöndun“:

„H65 Hættulegt heilsu: getur valdið lungnaskaða við inntöku.

Fljótandi efni og efnablöndur sem mönnum stafar hætta af við ásvelgingu vegna þess hve lítil seigja þeirra er:

a) Efni og efnablöndur sem í er samanlagt 10% eða meira af alifatískum, alísýklískum og arómatískum vetniskolefnum og hafa:

- styttri rennslistíma en 30 sek. í 3 mm ISO-bikarglasi samkvæmt EN 535, eða
- minni eðlisseigju en 7×10^{-6} m²/sek við 40 °C þegar mælt er með kvörðuðum glerpípuseigjumæli samkvæmt ISO-staðli 3104/3105, eða
- minni eðlisseigju en 7×10^{-6} m²/sek við 40 °C þegar mælt er með snúningsmæli samkvæmt ISO-staðli 3219.

Athugið að efni og efnablöndur, sem fullnægja þessum viðmiðunum, þarf ekki að flokka ef meðalyfirborðsspenna þeirra er meiri en 25 mN/m við 40 °C.

b) Önnur efni og efnablöndur sem falla ekki undir framantaldar viðmiðanir samkvæmt reynslu hjá mönnum.“

C. Í stað textans í lið 3.2.6.3. kemur eftirfarandi texti:

„3.2.6.3. *Ertíng öndunarfæra*

Eftirfarandi hættusetning skal valin í samræmi við tilgreindar viðmiðanir:

H37 Ertir öndunarfæri

Efni og efnablöndur sem valda alvarlegri ertíngu í öndunarfærum samkvæmt:

- athugunum á mönnum
- jákvæðum niðurstöðum úr viðeigandi dýraprófunum

Athugasemdir um notkun H37

Þegar raunathuganir á mönnum eru túlkaðar skal þess vandlega gætt að greina milli áhrifa sem leiða til flokkunar með H48 (sjá lið 3.2.4) og áhrifa sem leiða til flokkunar með H37. Áhrif, sem að jafnaði leiða til flokkunar með H37, ganga til baka og eru venjulega bundin við efri öndunarveg.

Jákvæðar niðurstöður úr viðeigandi dýrprófunum geta m.a. verið samkvæmt gögnum úr almennri eiturhrifaprófun, þar á meðal vefjameinafræðigögn um öndunarfærin. Gögn úr mælingum á hægöndun í tilraunum má einnig nota til að meta ertingu í öndunarvegi.“

D. Í stað textans í lið 3.2.7 Næming kemur eftirfarandi texti:

„3.2.7 Næming

3.2.7.1. Næming við innöndun

Efni og efnablöndur skal flokka sem ofnæmisvaldandi og tákna með „Xn“ og hættuábindingunni „Hættulegt heilsu“ ásamt hættusetningunni H42 í samræmi við eftirfarandi viðmiðanir.

H42 Getur valdið ofnæmi við innöndun

- ef vísbendingar eru um að efnið eða efnablandan geti kallað fram sérstakt ofnæmi í öndunarfærum.
- ef fyrir liggja jákvæðar niðurstöður úr viðeigandi dýrprófunum.
- ef efnið er ísósýanat, nema vísbendingar séu um að efnið valdi ekki ofnæmi í öndunarfærum.

Athugasemdir um notkun H42

Vísbendingar hjá mönnum

Vísbendingar um að efnið geti kallað fram sérstakt ofnæmi í öndunarfærum byggjast að jafnaði á reynslu hjá mönnum. Í þessu samhengi kemur ofnæmi að jafnaði fram sem asmi en önnur ofnæmisviðbrögð á borð við nefslímubólgu og lungnablöðrubólgu skulu einnig skoðuð.

Sjúkdómsástandið hefur klínísk einkenni ofnæmisviðbragða. Ekki er þó nauðsynlegt að sýna fram á gang ónæmisviðbragða.

Þegar athugaðar eru vísbendingar um váhrif á menn er nauðsynlegt að ákvörðun um flokkun sé byggð á eftirfarandi, auk vísbendinga frá sjúkdómstilvikum:

- fjölda þeirra sem verða fyrir váhrifum,
- umfangi váhrifa.

Framangreindar vísbendingar geta verið:

- sjúkrasaga og gögn úr viðeigandi prófunum á lungnastarfsemi, í tengslum við váhrif frá efninu, staðfest með öðrum vísbendingum, meðal annars:
 - efnið hefur svipaða byggingu og efni sem vitað er að valda ofnæmi í öndunarfærum,
 - ónæmisprófun í lífi (t.d. pikkhúðpróf),
 - ónæmisprófun í glasi (t.d. greining í sermi),
- rannsóknir sem kunna að benda til annarra sértækra verkana sem hafa ekki með ónæmi að gera, t.d. endurtekinnar smávægilegrar ertingar eða áhrifa sem tengjast lyfjagjöf,
- jákvæðar niðurstöður úr berkjuáreitisprófun með efninu, sem gerð er í samræmi við viðurkenndar viðmiðunarreglur um ákvörðun sérstakra ofnæmisviðbragða.

Sjúkrasagan ætti að ná yfir bæði heilsufarssögu og atvinnusögu til að unnt sé að sýna fram á tengsl milli váhrifa frá tilteknu efni og myndunar ofnæmis í öndunarferum. Meðal upplýsinga, sem hér skipta máli, eru þættir sem magna sjúkdómseinkennin, bæði á heimili og vinnustað, upphaf og framgangur sjúkdómsins, fjölskyldusaga og heilsufarssaga sjúklingsins. Heilsufarssagan ætti einnig að ná til annarra kvilla af völdum ofnæmis eða í öndunarvegi, allt frá bernsku, svo og reykningavenja.

Jákvæðar niðurstöður úr berkjuáreitisprófunum teljast nógu góðar vísbendingar til að byggja megi flokkun á þeim einum. Aftur á móti er vitað að í reynd munu margar af þeim rannsóknum, sem taldar eru hér að framan, þegar hafa verið gerðar.

Ekki ber að merkja efni með hættusetningunni H42 ef það kallar aðeins fram asmaeinkenni vegna ertingar hjá fólki með ofursvörun í berkjum.

Rannsóknir á dýrum

Gögn úr prófunum, sem kunna að benda til þess að efni geti valdið næmingu í mönnum við innöndun, eru m.a.:

- IgE-mælingar (t.d. í músum),
- sértæk lungnasvörun í naggrísunum.

3.2.7.2. Næming við snertingu við húð.

Efni og efnablöndur skal flokka sem ofnæmisvaldandi og tákna með „Xi“ og hættuábindingunni „Ertandi“ ásamt hættusetningunni H43 í samræmi við eftirfarandi viðmiðanir:

H43 Getur valdið ofnæmi við snertingu við húð

- ef reynslan sýnir að efnið eða efnablandan hafa valdið næmingu við snertingu við húð hjá talsverðum fjölda manna,
- ef fyrir liggja jákvæðar niðurstöður úr viðeigandi dýrprófunum.

Athugasemdir um notkun H43

Vísbendingar hjá mönnum

Eftirfarandi vísbendingar nægja til að flokka efni með H43:

- jákvæðar niðurstöður úr viðeigandi plástursprófunum, að jafnaði á fleiri en einni húðsjúkdómadeild, eða
- faraldsfræðilegar rannsóknir sem sýna að efnið hefur valdið exemi vegna snertiofnæmis. Líta ber með sérstakri alvöru aðstæður þar sem dæmigerð einkenni koma fram hjá tiltölulega mörgum þeirra sem verða fyrir váhrifum, jafnvel þótt tilvikin séu fá, eða
- jákvæð gögn úr tilraunarannsóknum á mönnum (sjá einnig lið 3.1.1).

Eftirtalið er nægilegt til að flokka efni með H43 þegar fyrir liggja viðbótarvísbendingar:

- einangruð dæmi um exem vegna snertiofnæmis, eða
- faraldsfræðilegar rannsóknir þar sem hending, kerfisbundin skekkja eða óskýrt orsakasamhengi hefur ekki verið útilokað svo fullnægjandi þyki.

Viðbótarvísbendingar geta verið:

- gögn úr dýrprófunum sem gerðar eru í samræmi við gildandi viðmiðunarreglur með niðurstöðu sem fullnægir ekki viðmiðuninum í kaflanum um rannsóknir á dýrum en kemst nægilega nálægt því til að teljast marktæk, eða
- gögn sem byggjast á óstöðluðum aðferðum, eða
- viðeigandi tengsl milli byggingar efnis og virkni.

Rannsóknir á dýrum

Jákvæðar niðurstöður úr viðeigandi dýraprófunum eru sem hér segir:

Ef notuð er ónæmisglæðaprófunin á húðnæmingu, sem um getur í V. viðauka, eða aðrar ónæmisglæðaprófanir er svörun, sem að minnsta kosti 30% tilraunadýranna sýnir, talin jákvæð. Við notkun hvers kyns annarra prófunaraðferða er svörun, sem að minnsta kosti 15% tilraunadýranna sýna, talin jákvæð.

3.2.7.3. Ónæmistengdur ofsakláði við snertingu

Sum þeirra efna, sem fullnægja viðmiðunum fyrir H42, kunna einnig að valda ónæmistengdum ofsakláða við snertingu. Í slíkum tilvikum ber að veita upplýsingar um ofsakláða við snertingu með því að nota viðeigandi varnaðarsetningar, venjulega V24 og V36/37, og í öryggisleiðbeiningunum.

Þegar efni kalla fram merki um ónæmistengdan ofsakláða við snertingu en uppfylla ekki viðmiðanir fyrir H42 ber að íhuga hvort rétt sé að flokka þau með H43.

Ekki er til viðurkennt dýralíkan sem nota má til að sanngreina efni sem valda ónæmistengdum ofsakláða við snertingu. Flokkunin hlýtur því að jafnaði að byggjast á visbendingum hjá mönnum sem eru svipaðar þeim sem eiga við um ofnæmi við snertingu við húð (H43).

3.2.7.4. Athugið að ef táknið „Xn“ og hættuábindingin „Hættulegt heilsu“ eru notuð, er valkvætt að nota táknið „Xi“ og hættuábindinguna „Ertandi“.

E. Í stað viðmiðana fyrir V62 í 6. þætti kemur eftirfarandi:

„V62 Varist að framkalla uppköst eftir inntöku. Leitið umsvifalaust lækni og sýnið umbúðir eða umbúðamerkingar

— Notkun:

— efni og efnablöndur sem eru flokkuð sem hættuleg heilsu með H65 í samræmi við viðmiðanir í lið 3.2.3,

— gildir ekki um efni og efnablöndur sem eru markaðssett á úðabrusum (eða í geymum með áföstum úðabúnaði), sjá 8. og 9. þátt.

— Notkunarviðmiðanir:

— skyldubundið á framangreind efni og efnablöndur ef þau eru seld almenningi eða líklegt er að hann noti þau,

— æskilegt á framangreind efni og efnablöndur þegar þau eru notuð í iðnaði.“

F. Eftirfarandi liður bætist við í 8. þætti:

„8.2. Gashylki undir própan, bútan eða fljótandi jarðolíugas (LPG)

Þessi efni eru flokkuð í I. viðauka. Þótt þau séu flokkuð í samræmi við 2. gr. eru þau ekki hættuleg heilsu manna ef þau eru markaðssett í lokuðum endurnýtanlegum gashylkjum eða einnotahylkjum, í skilningi EN 417, sem eldsneyti sem eingöngu er hleypt út til brennslu.

Þessi hylki skal merkja með viðeigandi tákni og hættu- og varnaðarsetningum sem varða eldfimi. Engar upplýsingar um áhrif á heilsu manna þurfa að koma fram á merkimiðanum. Sá sem ber ábyrgð á markaðssetningu efnisins skal þó láta fagmönnum í té þær upplýsingar um áhrif á heilsu manna sem hefðu átt að koma fram á merkimiðanum, með því sniði sem tilgreint er í 27. gr. tilskipunarinnar. Almennum notendum skulu veittar nægar upplýsingar til að þeir geti gert nauðsynlegar ráðstafanir um heilsuvernd og öryggisgæslu eins og mælt er fyrir um í 3. mgr. 1. gr. tilskipunar 91/155/EBE, eins og henni var breytt með tilskipun 93/112/EBE.“

G. Í stað fyrirsagnarinnar „8.2. Gegnheilir málmar“ kemur:

„8.3. **Gegnheilir málmar**“

H. Eftirfarandi liður bætist við í 8. þætti:

„8.4. **Efni sem eru flokkuð með H65**

Efni, sem eru flokkuð sem hættuleg heilsu, vegna þess að af þeim stafar hættu við ásvelgingu, þarf ekki að merkja sem hættuleg heilsu með H65 ef þau eru markaðssett í úðabrusum eða í geymum með áföstum úðabúnaði.“

I. Í stað textans í lið 9.1.3 kemur eftirfarandi texti:

„9.1.3. Merking

Kröfum um merkingu færanlegra gashylkja telst fullnægt ef þau eru í samræmi við b-lið 5. mgr. 8. gr. tilskipunar 88/379/EBE.

Þó má gera þá undantekningu frá 1. og 2. mgr. 8. gr. að láta snið og mál merkimiða fyrir gashylki, með rúmmál sem er 150 l eða minna, fylgja fyrirmælum ISO-staðals 7225. Þá getur merkimiðinn borið almennt heiti eða iðnaðar-/verslunarheiti efnablöndunnar, að því tilskildu að hættulegir efnisþættir efnablöndunnar séu skráðir með skýru og óafmáanlegu letri utan á gashylkið.

Veita má upplýsingarnar, sem tilgreindar eru í 7. gr., á endingargóðri upplýsingaplötu eða merkimiða sem er festur við geymana.”

J. Eftirfarandi liður bætist við í 9. þætti:

„9.2. **Gashylki undir efnablöndur sem innihalda ilmbætt própan, bútan eða fljótandi jarðolíugas (LPG)**

Própan, bútan og fljótandi jarðolíugas er flokkað í I. viðauka. Þótt efnablöndur, sem innihalda þessi efni, séu flokkuð í samræmi við 3. gr. tilskipunar 88/379/EBE eru þau ekki heilsuspillandi þegar þau eru markaðssett í lokuðum endurnýtanlegum gashylkjum eða einnotahylkjum, í skilningi EN 417, sem eldsneyti sem eingöngu er hleypt út til brennslu.

Þessi hylki skal merkja með viðeigandi tákni og hættu- og varnaðarsetningum sem varða eldfimi. Engar upplýsingar um áhrif á heilsu manna þurfa að koma fram á merkimiðanum. Sá sem ber ábyrgð á markaðssetningu efnisins skal þó láta fagmönnum í té þær upplýsingar um áhrif á heilsu manna sem hefðu átt að koma fram á merkimiðanum, með því sniði sem tilgreint er í 10. gr. tilskipunar 88/379/EBE. Almennum notendum skulu veittar nægar upplýsingar til að þeir geti gert nauðsynlegar ráðstafanir um heilsuvernd og öryggisgæslu eins og mælt er fyrir um í 3. mgr. 1. gr. tilskipunar 91/155/EBE.”

K. Í stað fyrirsagnarinnar „9.2. Málmblendi, efnablöndur sem innihalda fjölliður, efnablöndur sem innihalda gúmmílíki“ kemur:

„9.3. **Málmblendi, efnablöndur sem innihalda fjölliður, efnablöndur sem innihalda gúmmílíki**“

L. Eftirfarandi liður bætist við í 9. þætti:

„9.4. **Efnablöndur sem eru flokkaðar með H65**

Efnablöndur, sem eru flokkaðar sem hættulegar heilsu vegna þess að af þeim stafar hættu við ásvelgingu, þarf ekki að merkja sem hættulegar heilsu með H65 ef þær eru markaðssettar í úðabrusum eða í geymum sem eru búnir áföstum úðabúnaði.“

M. Í stað fyrirsagnarinnar „9.4. Lífræn peroxíð“ kemur:

„9.5. **Lífræn peroxíð**“
